

THESIS

MUNICH

1965

V
ay

**Karyometrische und autoradiographische
Untersuchungen
am Ehrlich-Mäuse-Ascites-Tumor**

Udo Löhrrs



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. W. Büngeler

**Karyometrische und autoradiographische
Untersuchungen
am Ehrlich-Mäuse-Ascites-Tumor**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Udo Löhrs
aus Emden/Ostfriesland

München 1965

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. M. EDER
Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. BÜNGELER
Dekan: Prof. Dr. O. HUG

Tag der mündlichen Prüfung: 9.2.1965

M E I N E N E L T E R N

INHALTSVERZEICHNIS

- I Einleitung
- II Methode
- III Ergebnisse
- IV Diskussion
- V Zusammenfassung
- VI Literatur

I. Einleitung

Experimentelle Untersuchungen mit malignen Tumoren sind möglich, seit Moreau und Hanau ihre Übertragbarkeit entdeckten und es Jensen als erstem gelang, ein Sarkom von Ratte zu Ratte zu transplantieren.

EHRlich und APOLANT veröffentlichten 1905 (zitiert nach 68) Arbeiten, in denen es ihnen gelungen war, aus einem spontan entstandenen Mamma-Carcinom der Maus einen Tumor zu gewinnen, der mit nahezu 100 %-igem Erfolg transplantiert werden konnte. Wenn dieses Carcinom durch intraperitoneale Injektion verimpft wurde, so entwickelten sich solide Peritonealtumoren mit Exsudation von Axcites. Daran anknüpfend erzielten LOEWENTHAL und JAHN (56) einen entscheidenden Fortschritt: Sie konnten 1930 wenige Tage nach intraperitonealer Injektion einer Ehrlich-Carcinom-Suspension carcinomatösen Ascites gewinnen, der in weiteren Passagen fortschreitend an Malignität und Virulenz gewann.

Dem liegt nach SCHÜMMELFEDER (71), KLEIN und KLEIN (46), KLEIN (45) und MAKINO und KOYOKO (57, 58) eine Selektion derjenigen Zellen aus der breit variierenden Population der primär soliden Geschwulst zugrunde, die sich unter den schlechteren Lebensbedingungen in der Bauchhöhle durchzusetzen vermögen. Es handelt sich demnach nicht um eine Adaptation oder Modifikation.

Die Selektion bewirkt eine gesteigerte Malignität und das Vorherrschen bestimmter Chromosomensätze. Nach HSU und MOORHEAD (39) scheint im Tumor-Wachstum eine Änderung der Malignität verknüpft zu sein mit einem Wechsel der Chromosomenzahl oder umgekehrt. Nach der stem-cell-Theorie des anglo-amerikanischen Schrifttums (HSU und MOORHEAD, MAKINO und KOYOKO (57), HSU (40)) wird bei jedem Ascites-Tumor durch die schlechten Lebensbedingungen, denen er unterworfen ist, eine bestimmte genetische Konstitution, ein "Klon", herausgezüchtet, die in dem heterogenen Zellkollektiv vorherrscht und zum Stamm des Tumors wird.

Der Ehrlich-Ascites-Tumor (EMAT) existiert heute in verschiedenen Chromosomenfrequenzmustern, wobei immer eine Ploidiestufe überwiegt (RUTISHAUSER (68)):

- Tetraploid (Klein, Stockholm)
- Hypertetraploid (Hauschka, Buffalo)
- Hyperdiploid (Lettré, Heidelberg)

Während in anglo-amerikanischen Ländern vorwiegend der tetraploide EMAT zu

experimentellen Untersuchungen (z.B. LEVAN (53, 54); HAUSCHKA und LEVAN (30)) verwendet wird, findet in Deutschland hauptsächlich die hyperdiploide Form Anwendung. Seine genetische Konstitution klärte BAYREUTHER (4) 1952 auf. Bei einem normalen diploiden Chromosomensatz der weissen Maus von $2n = 40$, fand er bei der überwiegenden Mehrzahl der Kerne (93 %) durchschnittlich 45 Chromosomen, d.h. Hyperdiploidie, und ein zweites Maximum bei tetraploider Chromosomenzahl. Diese Befunde wurden später mit geringen Abweichungen von SCHÜMMELFEDER und WESSEL sowie TJIO und LEVAN (zitiert (68)) bestätigt. Übereinstimmend beobachteten alle Untersucher eine verstärkte aneuploide Variation gegenüber normalen Geweben.

Tierersparnis, exakte Dosierbarkeit, sichere Übertragbarkeit und besonders die Rückführbarkeit in die solide Wuchsform machen den EMAT zu einem der am meisten verwendeten Geschwülste in der experimentellen Tumorforschung.

Trotzdem fehlten lange Zeit systematische morphologische und histochemische Untersuchungen über die frühen Entwicklungsstadien des in solide Wuchsform übergeführten EMAT. EDER und WRBA (11) konnten spätestens 15 bis 30 Minuten nach subkutaner Implantation verstärkte Fermentaktivitäten beobachten, die sie als Summationseffekt des veränderten biologischen Milieus und physikalischer Faktoren bei der technischen Praeparation deuten.

Bereits in den ersten Stunden differenziert sich eine histochemisch und morphologisch gut zu unterscheidende Aussen- und Innenzone. Die scharf abgegrenzte Aussenzone wird von grossen Zellen mit grossen Kernen gebildet, in denen die Reaktionen für DPN-Diaphorase und DPN-abhängige Dehydrasen (Lactat- Äpfelsäure-, α -Glycerophosphat-Dehydrase) stark positiv ausfallen. Dagegen wird in der kleinzelligen Innenzone die Reaktion der Succinodehydrase stark positiv, die in der Aussenzone wesentlich schwächer ausfällt. An der Grenze zwischen Aussen- und Innenzone entsteht nach etwa 24 Stunden eine leukocytenreiche Nekroseschicht. Nach 2 bis 3 Tagen geht aus der Aussenzone das solide Wachstum hervor, während die kleinen Zellen der Innenzone noch nach Tagen nachweisbar sind. WRBA und EDER (79) konnten zeigen, dass diese Innenzonenzellen zumindest in der Frühphase imstande sind, nach Umlagerung die Eigenschaften der Aussenzone wiederzuerlangen.

Zur quantitativen Beurteilung dieser frühen Umgestaltungsphänomene des Ehrlich-Ascites-Carcinoms im solid wachsenden subkutanen Implantat erschien es notwendig, die Kerngrössenveränderungen karyometrisch zu erfassen und ihre Natur durch gleichzeitige karyometrische und autoradiographische Messungen

aufzuschlüsseln.

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht (EDER und WRBA (13); EDER, WRBA und LÖHRS (12)).

II. Methode

Alle Untersuchungen wurden an der institutseigenen Linie des hyperdiploiden Ehrlich-Mäuse-Ascites-Tumor (EMAT) durchgeführt, der auf Händlermäusen gehalten wird, die sich vom NMRI-Mäusestamm herleiten.

Die Kerngrößen wurden bestimmt, indem im Projektionsmikroskop die grössten Umrisse der Kerne auf Zeichenkarton gezeichnet, ausgeschnitten und gewogen wurden (HEIBERG (31)). Da 1 mg des verwendeten Kartons einer Fläche von $3,9 \text{ mm}^2$ entspricht, wurden die Gewichte durch Multiplikation in Flächeneinheiten umgewandelt. Da die Kernanschnitte vorwiegend rund erschienen, wurden die gefundenen Flächenwerte als Kugelquerschnitte im grössten Durchmesser betrachtet und demgemäss über die Flächenformel für Kugelquerschnitte ($F = \pi r^2$) das Volumen als $V = 4/3 \pi r^3$ errechnet.

Versuchsanordnungen:

1. Um die Entwicklung solider Geschwulsttransplantate untersuchen zu können, wurden Mäusen jeweils 0,2 ml native EMAT-Flüssigkeit subkutan injiziert. Die Untersuchung der Implantate erfolgte nach 1, 4, 7, 22, 24, und 48 Stunden sowie nach 3, 4 und 6 Tagen. Nach Fixierung in Zenker'scher Lösung und nachfolgender Paraffineinbettung wurden 5μ dicke Schnitte hergestellt und nach Feulgen gefärbt. Zur Wahrung gleicher präparativer Bedingungen wurden die Zellen des Ausgangsascites angereichert, in gleicher Weise nach Zenker fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Bestimmung der topographischen Lokalisation der Kerngrößenveränderungen erfolgte in einer kontinuierlichen Zeichenreihe quer durch das Geschwulstimplantat hindurch. Zu diesem Zweck wurden jeweils die in einem Blickfeldausschnitt bei Ölimmersion gezeichneten Kerne (durchschnittlich 25 bis 35) in einer Gruppe zusammengefasst, diese gewogen und daraus die durchschnittliche Grösse in Volumeneinheiten (Vol.E.) errechnet.

Zur genaueren Untersuchung der Innenzone wurden von den 1, 7, 22, 48 Stunden und den 3, 4 und 6 Tagen alten subkutanen Tumorimplantaten jeweils

200 oder 100 sichere Innenzonenkerne gemessen.
Insgesamt wurden auf diese Weise 5930 Kerne bestimmt.

2. a) Vergleich von Ehrlich-Ascites-Tumoren von verschiedenen Tieren, aber nach gleicher Wachstumsdauer:

Ein EMAT-Gemisch von verschiedenen Tieren wurde 3 Mäusen in Dosen von je 0,5 ml intraperitoneal injiziert und diese 5 Tage später getötet. Von den Ascites-Tumoren wurden Ausstriche angefertigt, die luftgetrocknet und mit Haemalaun gefärbt wurden. Von den drei Asciten wurden je 100 Kerne nach der oben beschriebenen Methode gemessen.

b) Vergleich von Ehrlich-Ascites-Tumoren verschiedenen Alters:

Ein 10 Tage lang auf einer Maus gewachsener EMAT wurde mehreren Mäusen in Dosen von jeweils 0,5 ml intraperitoneal überimpft. Die Tiere wurden 24 Stunden und 7 Tage post injectionem getötet. Ein weiteres Tier wurde nach 24 Stunden getötet. Es hatte 0,5 ml EMAT intraperitoneal bekommen, der zwischenzeitlich 48 Stunden lang auf einer anderen Maus gewachsen war.

3. Luft-Taschen-Versuch: Durch wiederholte subkutane Injektion von Luft wird die Ausbildung einer von Bindegewebe abgekapselten Kammer erreicht (sogenannte check-pouch nach Selye). 4, 13 und 17 Tage nach der ersten Luftinjektion wurden je zwei Tieren 0,2 ml nativer Ascitestumor in die Taschen gespritzt und die Tiere 24 Stunden später getötet. Die mit Tumor-Ascites gefüllten Taschen wurden in toto nach Zenker fixiert, in Paraffin eingebettet und zu 5 μ dicken Schnitten verarbeitet, die nach Feulgen gefärbt wurden. Von dem ebenso Zenker-fixierten und in Paraffin eingebetteten Ausgangs-Ascites und den drei verschiedenen Zeitwerten wurden für je 100 Kerne nach der oben beschriebenen Methode die Volumina ermittelt.

4. Gleichzeitige karyometrische und autoradiographische Untersuchungen⁺ / erfolgten an einem subkutanen Tumor-Implantat und 3 Tumor-Asciten. Dabei wurde die subkutan wachsende Geschwulst 48 Stunden nach ihrer Transplantation durch eine einmalige Injektion von ³H-Thymidin (100 mikro C/0,5 ml; spezifische Aktivität 3,0) markiert und die tumortragenden Tiere 1 Stunde später getötet. Nach Entnahme des Transplantats, Fixierung in Formol (10 %) und Einbettung in Paraffin wurden an 5 μ dicken Schnitten die Kerne der Innenzone aus-

⁺ / Die karyometrischen und autoradiographischen Untersuchungen wurden in Zusammenhang mit einer gleichzeitig durchgeführten Arbeit von H.H. Muth vorgenommen.

gewertet. Die Untersuchungen von Tumor-Ascites-Kernen erfolgten an 3 Tieren, 2 und 4 Tage nach Tumorüberimpfung, nach einstündiger ^3H -Thymidin-Markierung (10 mikro C/0,5 ml). Zur autoradiographischen Untersuchung wurden die luftgetrockneten Ausstriche mit Stripping-Film (Kodak AR 10) sowie mit flüssiger Emulsion (K₂ Ilford) 14 und 21 Tage exponiert und dann mit Haematoxilin (Böhmer)-Eosin gefärbt. Von jedem Praeparat wurden an je 100 Kernen die Silberkornzahlen bestimmt und gleichzeitig die Kernvolumina ermittelt.

Bei dem 48 Stunden alten subkutanen Geschwulst-Transplantat und einem 4 Tage alten Ascites- Tumor (Ausstrich) wurden den 100 markierten Kernen noch je 100 unmarkierte zu einem Grössenvergleich gegenübergestellt.

Insgesamt wurde das Volumen von 7230 Kernen bestimmt.

III. Ergebnisse

Bereits 1 Stunde nach subkutaner Implantation von EMAT lässt sich deutlich eine grosszellige Aussenzone von einer kleinzelligen Innenzone unterscheiden (s. Abb.1a) (EDER und WRBA (11, 13); EDER, WRBA und LÖHRS (12)). Während nach etwa 2 bis 3 Tagen aus der Aussenzone das solide Wachstum hervorgeht, sind die kleineren und dicht angefärbten Innenzonen-Kerne noch nach 6 Tagen nachweisbar, verfallen dann aber mehr und mehr der Nekrobiose. Nach etwa 24 Stunden entwickelt sich zwischen den beiden Zonen eine Nekroseschicht, in der sich massenhaft Leukocyten neben pyknotischen Kernen und Kerntrümmern anhäufen.

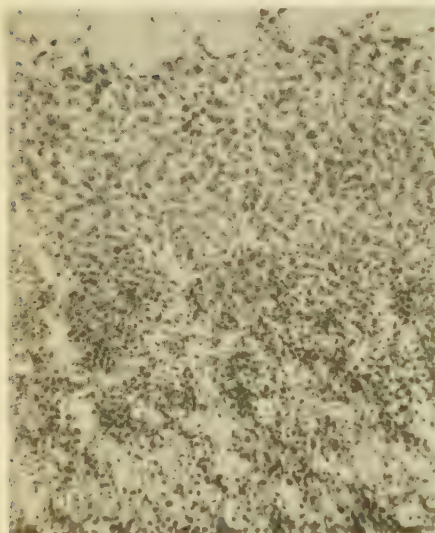
Werden ausschliesslich Schnitte ausgewertet, die keinen Anhalt für schräge Schnittführung bieten, so zeigt sich regelmässig und bereits nach 1 Stunde ein deutlicher Abfall der Kerngrössen im Bereich der mikroskopisch sichtbaren Grenze (s. Abb.2).

Tabelle 1: Durchschnittliche Kernvolumina zu verschiedener Zeit nach der Implantation
(Durchschnittsvolumen des Ausgangsascites 290 Vol.E.):

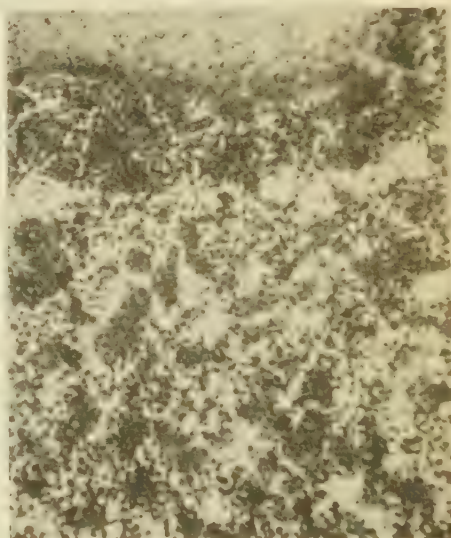
	Kernvolumen nach							
	1 h	4 h	7 h	24 h	48 h	3 d	4 d	6 d
Aussenzone	424	388	431	530	350	-	445	480
Innenzone	287	244	231	131	91	165	159	100

Die 3-, 4- und 6-Tage-Werte der Innenzone wurden als Durchschnittswerte von 100 bis 150 Einzelkernmessungen gewonnen.

Wie aus der Tabelle und Abbildung 2 hervorgeht, reagieren diejenigen Asciteszellen, die bei der subkutanen Implantation an den Rand des Tumorknotens und in gute Ernährungsbedingungen vom umgebenden Wirtsgewebe kommen, mit einer durchschnittlichen Kernvergrößerung. Diese lässt sich bereits nach Stunden klar erkennen. Ebenso deutet sich nach 1 Stunde eine Verkleinerung der Innenzone schwach an, die jedoch nach 4 Stunden klar zu erkennen ist.



A



B

Abb. 1:

- A: Ehrlich-Ascites-Tumor 21 Stunden nach subkutaner Implantation. Unterhalb des subkutanen Fett-Bindegewebes (oberer Bildrand) ist deutlich eine grosszellige Aussenzone von einer kleinzelligen Innenzone zu unterscheiden. (H.E.-Färbung, Vergrößerung 120-fach).
- B: Ehrlich-Ascites-Tumor 24 Stunden nach Injektion in eine bindegewebig abgekapselte, subkutane Luftpasche (check-pouch). In der Tasche finden sich fast ausschliesslich kleine, der Innenzone des subkutanen Implantats entsprechende Zellen, die bis an die bindegewebige Kapsel (unterhalb des subkutanen Fett-Bindegewebes am oberen Bildrand) heranreichen. Eine Aussenzone ist nicht entwickelt. (H.E.-Färbung, Vergrößerung 120-fach).

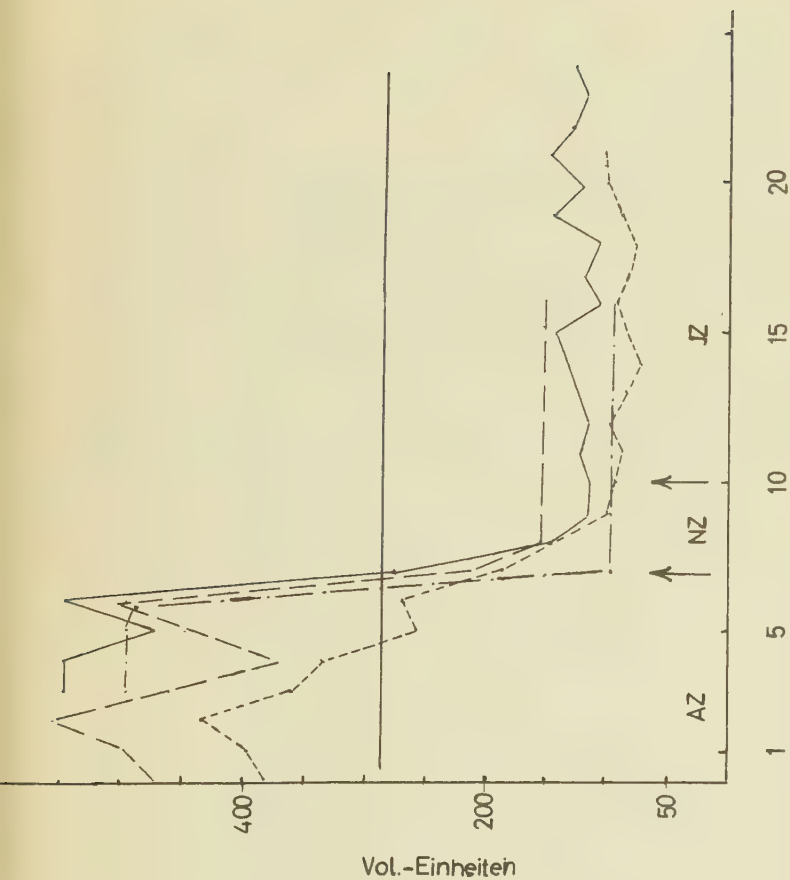


Abb. 2:

A: Topographie der Kernvolumenänderungen im subcutanen Implantat 1 (-----), 4 (---) und 7 Stunden (-----) nach Überimpfung. Jede Abszisseinheit entspricht einem Blickfeldausschnitt bei Ölimmersion in einer kontinuierlichen Zeichenreihe quer durch einen Schnitt. Die Pfeile bezeichnen die mikroskopisch sichtbaren Grenzen zwischen Aussonnezone (AZ) und Innenzone (IZ). Die ausgezogene Linie entspricht dem mittleren Volumen des Ausgangs-Ascites.



Abb. 2:

B: Topographie der Kernvolumenänderungen bis etwa zur Mitte der Innenzone 24 (—) und 48 Stunden (-----) sowie 4 (— · —) und 6 Tage (----) nach Überimpfung. Die Pfeile bezeichnen die mikroskopisch sichtbaren Grenzen zwischen Aussen- (AZ), Nekrose- (NZ) und Innenzone (IZ). Die ausgezogene Linie entspricht dem mittleren Volumen des Ausgangs-Ascites.

Während die Kenvolumina in der Aussenzone im Verlauf der weiteren Entwicklung zwar schwanken, jedoch nie unter den Wert des Ausgangsascites fallen, nimmt die durchschnittliche Kerngrösse in der Innenzone bis 48 Stunden nach Implantation laufend ab. 48 Stunden nach der Transplantation werden auch die Zellen in den inneren Schichten der Aussenzone kleiner.

In den Implantaten, die später als 48 Stunden entnommen wurden, fallen die Kerngrössen wieder steil zur Innen- bzw. Nekrosezone ab, ohne sich bereits in den inneren Aussenzonenanteilen zu verkleinern. Auffallenderweise nehmen auch die Kerngrössen der Innenzone wieder zu, verringern sich jedoch vom 3. Tag an erneut.

Die Differenz zwischen Aussen- und Innenzone wurde durch Einzelmessungen von je zweihundert Kernen aus beiden Zonen nachgeprüft. Als Mittelwerte ergaben sich dabei für die Aussenzone 476 Vol.E. und für die Innenzone 170 Vol.E. Das Durchschnittsvolumen des Ausgangs-Ascites-Tumors beträgt 240 Vol.E. Das entspricht einer durchschnittlichen Kerngrössenzunahme um 64 % in der Aussenzone und einer Abnahme um 43 % in der Innenzone.

Die Mittelwertsunterschiede wurden nach dem Sigma-Differenz-Test (modifizierter t-Test) mit $n_1 + n_2 - 2$ Freiheitsgraden statistisch geprüft (KOLLER (50); HOSEMANN (37)).

Formel:
$$M_x = \frac{\sum x}{n} \quad s^2 = \frac{\sum (x - M_x)^2}{n-1}$$

$$\sigma \text{ Diff.} = \sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}} \quad z = \frac{M_{x1} - M_{x2}}{\sigma \text{ Diff.}}$$

Zeichen: x: Messwert; n: Anzahl der Messwerte; M_x : Arithmetisches Mittel;
 s^2 : Varianz. σ Diff.: Mittlerer Fehler der Mittelwertsdifferenz;
 z: Quotient aus der Mittelwertsdifferenz und σ Diff.

Ergebnis: $z = 17,3$

Das bedeutet, dass die Differenz der Mittelwerte 17,3 mal grösser ist als ihr mittlerer Fehler. Auf der Basis der 3-Sigma-Regel (KOLLER (50)) liegt der kritische Wert für die Sicherung des Unterschiedes bei $z = 3,04$. Werte unter 3,04 sprechen für eine zufällige Schwankung von zwei Mittelwerten aus einer identischen Grundgesamtheit, Werte darüber erlauben den Schluss auf zwei verschiedene Grundgesamtheiten. Mit dem Wert von 17,3 kann die Volumendifferenz

zwischen den Kernen der Aussen- und der Innenzone also als statistisch signifikant angesehen werden.

Die Verteilung der Kerngrößen wurde nach der von HINTZSCHE (32) angegebenen Methode graphisch dargestellt, um ein etwaiges rhythmisches Wachstum deutlich zu machen, das sich bei der linearen Darstellung der Flächenwerte vermuten liess.

Nach HINTZSCHE werden rhythmische Wachstumsvorgänge erst dann eindeutig sichtbar, wenn homologe biologische Vorgänge durch gleiche Abstände auf den Koordinaten wiedergegeben werden. In einer Zellpopulation mit mehreren Regelklassen liegen bei linearer Darstellung die niedrigen dichter zusammen als die höheren, deren Abstände durch viel mehr Messeinheiten unterteilt werden. Jedoch sind der relative Anteil der einzelnen Kerne, die Breite und die Steilheit der Gipfel bei den kleinen und grösseren absoluten Werten nur dann zu vergleichen, wenn biologisch gleichwertige Abstände - die Abschnitte zwischen zwei Regelklassen - auch graphisch durch gleiche Strecken wiedergegeben werden. Da die Werte der Verdoppelungsklassen den Proportionen der geometrischen Reihe entsprechen, brauchen für ihre absoluten Zahlen nur deren Logarithmen eingesetzt zu werden, um gleiche Abstände zu erzielen. Die Strecke zwischen zwei Regelklassen wird in drei Unterklassen eingeteilt, die Klassenumfänge nach festen Proportionen berechnet.

Die Volumenverteilungskurven der Kerne des Ausgangsascites, der Innen- und Aussenzone verlaufen weitgehend parallel, die Innenzonen nach links und die Aussenzone nach rechts verschoben (Abb. 3). Die Analyse der Ascites-Verteilungskurve ergibt 2 Hauptgipfel, von denen der erste eine Stufe aufweist und an beiden Enden der Kurve je ein relativ niedriges Plateau. Diese Maxima und Plateaus seien mit römischen Ziffern als I, IIa, II, III und IV bezeichnet (s. Abb. 3). Man findet in allen drei Kurven zwischen I und II, IIa und III sowie zwischen II und IV eine ziemlich genaue Verdoppelung des Volumens.

Die Rechtsverschiebung bei der Aussenzone und die Linksverschiebung der Innenzone vollzieht sich andeutungsweise durch Verdoppelung bzw. Halbierung der Gipfelklassen. Für die Innenzone trifft das bei den Klassen I, IIa, III und IV genau zu, nicht für die Klasse II, die mit III verschmolzen ist. In der Aussenzone sind die Gipfel II und IV genau, I, IIa und III annähernd verdoppelt.

Daraus folgt, dass sich die Kernvolumina in ihren Maxima wenigstens teilweise verdoppeln bzw. halbieren können, die Häufigkeitsverteilungen in ihren Proportionen aber gleich bleiben.

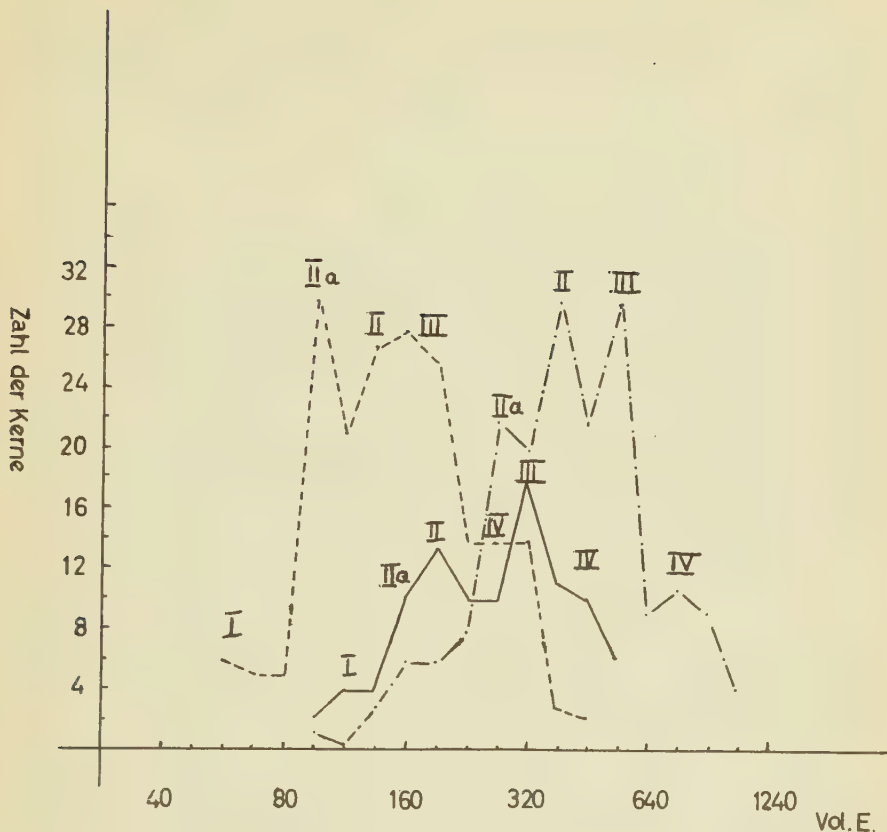


Abb. 3:

Volumenverteilungskurven für je 200 Zellkerne der Aussenzone (---) und der Innenzone (-.-.-) eines 22 Stunden alten subkutanen Implantats im Vergleich zu 100 Kernen des Ausgangs-Ascites (—), dargestellt nach HINTZSCHE. Die römischen Ziffern kennzeichnen die im Text erwähnten Maxima.

Mittlere Volumenswerte:

IZ 167 Vol.E.

AZ 476 Vol.E.

Ausgangs-Ascites 290 Vol.E.

Um zu versuchen, den Mechanismus der Verkleinerung genauer zu analysieren, wurden die Volumen-Verteilungskurven zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten ermittelt (Abb. 4). Wie sich bereits an dem Verhalten der Mittelwerte (Abb. 1) ablesen liess, verschieben sich die Kerngrössen umso mehr, je länger sie den schlechten Ernährungsbedingungen der Innenzone ausgesetzt sind. Auch hier wird deutlich, dass die Volumina des 3-Tage-Wertes gegenüber denen der 48 Stunden alten Innenzone wieder zunehmen, nachdem sich bis zu diesem Zeitpunkt fortlaufend verkleinert haben.

Während beim 1-Stundenwert die Kernvolumina bei 320 Volumeneinheiten kumulieren, wiederholen die 7-, 22- (s. auch Abb. 3) und 48-Stundenwerte die Form des Ausgangsascites mit unterschiedlicher Deutlichkeit, verschieben sich dabei aber fortlaufend in kleinere Volumensbereiche, so dass beim 48-Stundenwert der Gipfel bei 320 Volumeneinheiten vollständig verschwunden ist und der Hauptanteil der Kerne etwa 80 bis 100 Volumeneinheiten gross ist und ein zweiter kleinerer Gipfel sich bei 160 Volumeneinheiten ausbildet. Drei Tage nach der subkutanen Implantation entwickelt sich eine Verteilung, die noch immer mit der des Ausgangsascites vergleichbar ist, das Hauptmaximum liegt jetzt aber bei 160 Volumeneinheiten. Die Verteilungen der IZ-Kerne des 4- und 6-Tage-Wertes ähneln sich in der Form, der 4-Tage-Wert streut breit um die Volumenklasse 160, der 6-Tage-Wert jedoch um etwa 80 Vol.E.

Vergleicht man die Maxima in den einzelnen Kurven, so fällt auf, dass bestimmte Volumensklassen gehäuft vorkommen. Während an den früheren Untersuchungszeitpunkten mehrere Gipfel um 320 und 160 Volumeneinheiten liegen, findet man später die meisten Maxima bei 160 und um 80 Vol.E.

Ähnliche Phänomene lassen sich auch bei den Tumorzellen nachweisen, die in die Luftsaschen eingebracht wurden (Abb. 1b und Abb. 5). Die Bindegewebskapsel bewirkt dabei offensichtlich eine Stoffwechselbegrenzung, so dass die Tumorzellen den Zellen der Innenzone des subkutanen Implantats nach 24 Stunden gleichen. Wie diese (WRBA und EDER (79)) nehmen auch die Zellen in der Luftsache wieder die Eigenschaften der Aussenzone an, wenn eine halbierte Kapsel subkutan reimplantiert wird und die Zellen am offenen Ende der Kapsel wieder in günstigere Umgebung kommen. Wenn Tumorzellen bei der Injektion in die Bindegewebskapsel gepresst wurden oder am Stichkanal liegen geblieben sind, entwickeln sie sich zu den typischen grösseren Aussenzonenzellen.

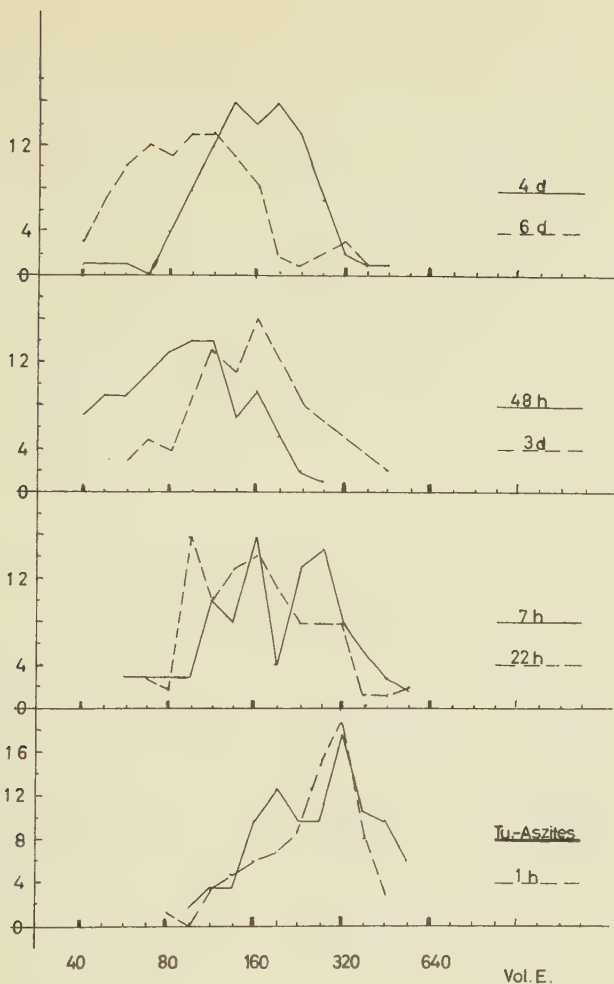


Abb. 4:

Volumensverteilungen von jeweils 100 Zellkernen der Innenzone 1 Stunde (nur 80), 7, 22 und 48 Stunden sowie 3, 4 und 6 Tage nach subkutaner Implantation, dargestellt nach HINTZSCHE.

Mittlere Volumenswerte:

	Ausgangs-Aszites	290 Vol.E.
1 Stunde	265 Vol.E.	3 Tage 165 Vol.E.
7 Stunden	215 " "	4 Tage 159 Vol.E.
22 Stunden	167 " "	6 Tage 100 Vol.E.
48 Stunden	90 " "	

Wie aus Abb. 5 hervorgeht, weist die Verteilungskurve des Ausgangsascites bei etwa 135 und bei 270 und mit einem Plateau zwischen 320 und 540 Vol.E. drei Maxima auf. Die Volumina der Zellkerne in den Lufttaschen nehmen wie in der Innenzone des subkutanen Implantats gegenüber dem Ausgangsascites erheblich ab. Die Mittelwerte sinken von 260 auf durchschnittlich etwa 130 (121, 131, 137) Vol.E. Entsprechend verschieben sich die Kurvenmaxima in kleinere Bereiche, wobei die Verteilungskurven teilweise der des Ausgangsascites ähnlich sind und auch hier wieder eine Gipfelhäufung bei Volumenwerten auffällt, bei denen sich auch im Ausgangsascites bereits ein Maximum ausbildet. Dabei besteht in den 4, 13 und 17 Tage alten Lufttaschen kein wesentlicher Unterschied in den dargestellten Kernveränderungen der Tumorzellen.

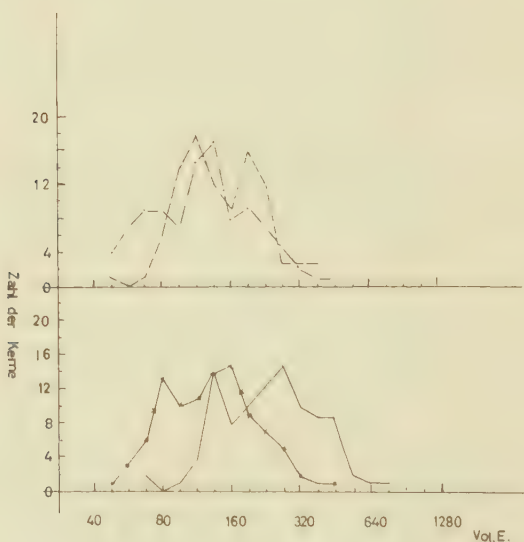


Abb. 5:

Volumensverteilungskurven von je 100 Zellkernen aus einer 4 Tage (-----), 13 Tage (---x---) und 17 Tage (---) alten subkutanen Lufttasche im Vergleich zum Ausgangs-Ascites (—————).

Nähere Erklärung im Text.

Mittlere Volumenswerte:

Ausgangs-Ascites	260 Vol.E.
4 Tage	121 " "
13 Tage	137 " "
17 Tage	131 " "

Der Einfluss des Wirtstieres auf die Entwicklung des EMAT wurde an Ausstrichen von Ascites-Tumoren untersucht (Abb. 6), die 5 Tage lang auf 3 verschiedenen Tieren gewachsen waren. Trotz sichtbarer Mittelwertsunterschiede (500, 540 und 590 Vol.E.) haben alle drei Verteilungen eine sehr ähnliche Form. Dabei zeigen zwei Kurven einen weitgehend identischen Verlauf, in der dritten ist das erste Maximum offensichtlich aus zwei Gipfeln zusammengesetzt, die sich in den anderen beiden Darstellungen getrennt abbilden.

In den drei Ascites-Ausstrichen lässt sich eine "rhythmische" Verteilung (JACOB (43, 44); WERMEL und SCHERSCHULSKAJA (77)) von vier Volumensklassen erkennen: die Volumenwerte von I und III verhalten sich wie 1 : 2, die Klasse II liegt genau auf der Mitte zwischen beiden. Um den nicht ganz exakt verdoppelten Volumenwert von II verteilen sich die Kerne des Maximums IV. Der Einfluss verschiedener Wirtstiere scheint sich also auf einen Ascites-Tumor in gleicher Weise auszuwirken.

Dagegen treten deutliche Unterschiede zutage, wenn man Ascites-Tumoren in verschiedenen Zeitabständen nach Überimpfung untersucht (Abb. 7). Vergleicht man die Ascites-Tumoren mit dem ursprünglichen 10 Tage alten EMAT, so fällt die durchschnittliche Verkleinerung auf, besonders 24 Stunden nach Überimpfung, die hauptsächlich durch die Erniedrigung des Maximums im höheren Volumenbereich und der Zunahme der Gipfel in den kleineren Volumensklassen entsteht. Nach 7 Tagen bietet sich ein ähnliches Bild, wenn auch das mittlere Volumen inzwischen wieder angestiegen ist. Auch in diesem Versuch fällt die Häufung der Maxima in bestimmten Volumensklassen auf, und zwar bei 60 und zwischen 60 und 120 sowie verdoppelt zwischen 120 und 240 und bei 240 Vol.E. Wie schon bei den vorher beschriebenen Versuchen, scheinen also auch hier trotz der Tendenz zur allgemeinen Volumenverminderung bestimmte Klassen gehäuft vorzukommen.

Allerdings verwischen sich sowohl im lange bestehenden (10 Tage) Tumor-Ascites (Abb. 7) als auch in der Innenzone älterer (4 und 6 Tage subkutaner Implantate (Abb. 4) die verschiedenen Volumensklassen. In zunehmendem Masse tritt eine Vereinheitlichung der Kernvolumina mit der Entwicklung eines breit gestreuten Volumenmaximums in Erscheinung. Andeutungen der ursprünglichen Klassen sind beim 10 Tage alten Ascites noch erkennbar.

An Hand der gleichzeitigen karyometrischen und autoradiographischen Messungen wurde geprüft, ob ein Zusammenhang zwischen Kernvolumen und eingebautem ^3H -Thymidin besteht, um die Volumensklassen des subkutan und intraperitoneal wachsenden EMAT genauer aufzuschlüsseln.

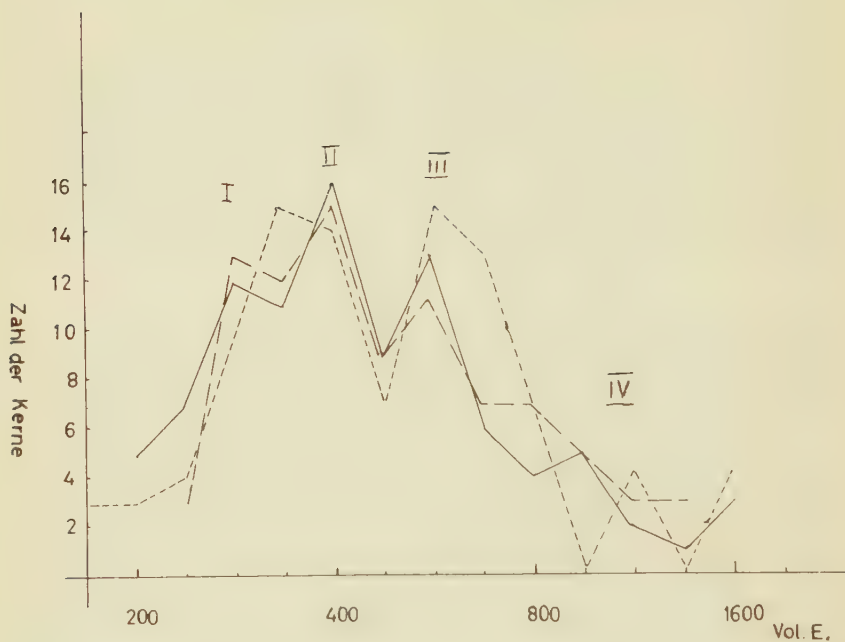


Abb. 6:

Volumenverteilungen von je 100 Zellkernen aus drei Ascites-Tumoren von verschiedenen Tieren, 5 Tage nach der Überimpfung, ermittelt an Ausstrichen.

Mittlere Volumenswerte:

- A (—) 500 Vol.E.
- B (---) 590 Vol.E.
- C (----) 540 Vol.E.

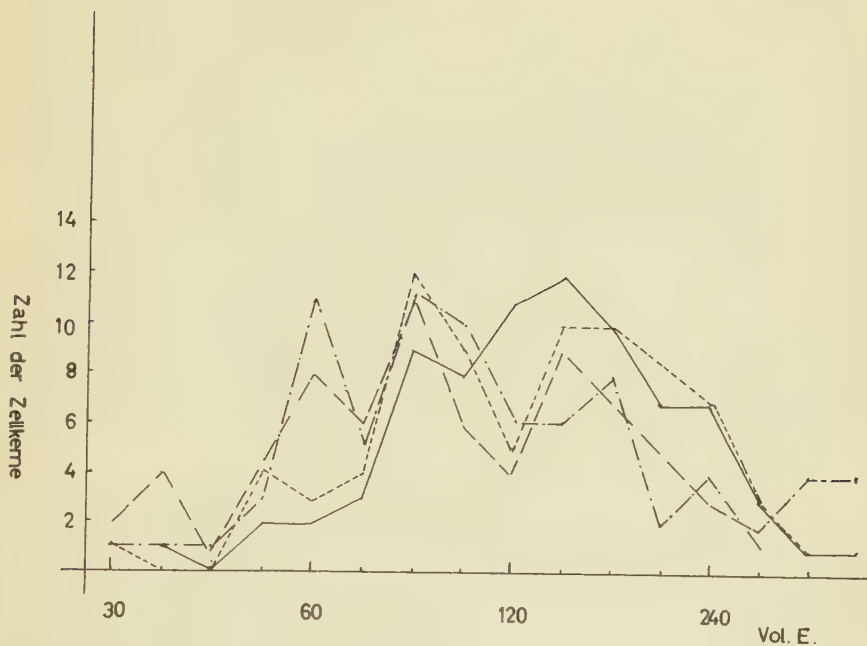


Abb. 7:

Die Kurven zeigen die Volumensverteilungen von je 100 Zellkernen von Tumor-Asciten verschiedenen Alters.

- (—) Ausgangs-Ascites
- (---) 24 Stunden nach Überimpfung
- (- - - -) 7 Tage nach Überimpfung
- (.....) 24 Stunden nach zwischenzeitlicher Passage von 48 Stunden

Aus zahlreichen methodischen Untersuchungen über Verwendbarkeit und Aussagefähigkeit der autoradiographischen Darstellung eingebauten ^3H -Thymidins geht hervor (z.B. KOBURG und MAURER (49); EDWARDS et al. (17); GALL (19); OEHLERT, SEEMAYER und LAUF (61)), dass hierdurch lediglich das in die Desoxyribonukleinsäure (DNS) eingebaute markierte Thymidin erfasst wird (KOBURG (53)). Weiterhin steht fest, dass Thymidin proportional dem DNS-Gehalt eines Kerns eingebaut wird, so dass Kerne verschiedener Ploidiestufen unterschiedliche Mengen von Thymidin inkorporieren (z.B. MAURER und KOBURG (59)). Diese Unterschiede können durch Bestimmung der Silberkornzahl erfasst werden, die durch die beta-Strahlung des Tritiums erzeugt werden. Für zahlreiche normale Gewebe (OEHLERT und BÜCHNER (62); QUASTLER und SHERMAN (67); MAURER und KOBURG (59); KOBURG und SCHULTZE (48); TAYLOR (75); PAINTER (64)) wurden die Phasen des Generationszyklus bestimmt und für die DNS-Synthesephase und die Mitose auffallend konstante Zeiten von etwa 6 bis 8 bzw. von einer Stunde ermittelt. Auch Ascites-Tumorzellen, vor allem der EMAT, der in vorliegenden Untersuchungen verwandt wurde, ist von verschiedenen Autoren daraufhin analysiert worden (EDWARDS, KOCH et al. (17); OEHLERT et al (61); BASERGA (3)), wobei anscheinend relativ grosse Variationen, z.B. vom Alter des Tumors abhängig, der postmitotischen, praesynthetischen Ruhephase beobachtet wurden.

Für die nachfolgenden Untersuchungen ist wesentlich, dass zwar die Synthesezeit etwas länger als in normalen Geweben zu dauern scheint (BASERGA (3)), die praemitotische Ruhephase jedoch mit 1,5 bis 2 Stunden angegeben wird. Das bedeutet, dass bei einstündiger Verfügbarkeitszeit des ^3H -Thymidins markierte Zellen in unseren Versuchsanordnungen keine nachfolgende Zellteilung durchgemacht haben, so dass die Ag-Korn-Zahl als Mass für den DNS-Gehalt des synthetisierenden Zellkerns verwandt werden kann.

Die gleichzeitigen karyometrischen und autoradiographischen Messungen (s. Methode) wurden an einem 48 Stunden alten und an zwei 4 Tage alten Ascites-Tumoren sowie an der Innenzone eines 48 Stunden alten subkutanen Implantats durchgeführt. EDER, WRBA und MUTH (15) fanden übereinstimmend mit anderen Autoren (OEHLERT, LAUF, SEEMAYER (69)) im Ascites-Tumor etwa 29 % der Zellkerne markiert, wobei der Ausgangsascites etwa gleich alt war, und beobachteten auch in der Innenzone von 48 Stunden alten subkutanen Geschwulstknoten DNS-synthetisierende Zellen.

Diese Befunde liessen sich bestätigen, da in der hier gewählten Versuchsanordnung in der Innenzone nach 48 Stunden etwa 13 % synthetisierende Kerne nachzuweisen waren. Für einen 4 Tage alten Ascites-Tumor und die Innenzone eines

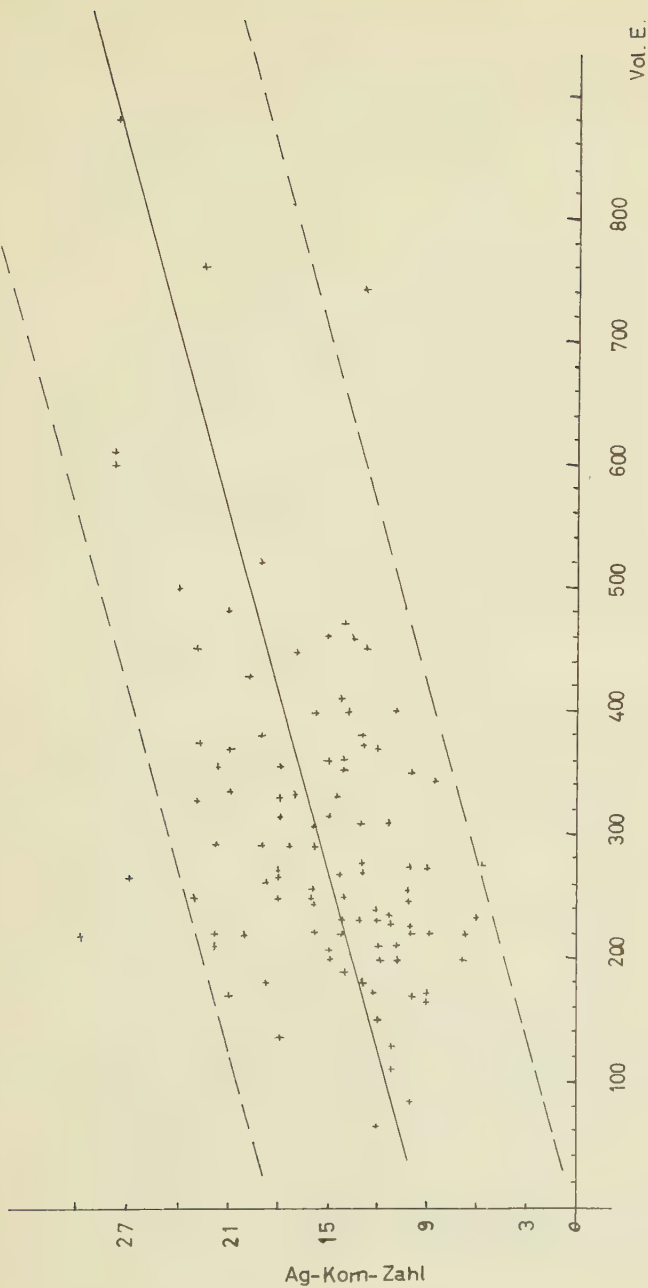


Abb. 6:

Silberkornzahl als Funktion des Kernvolumens bei der Innenzone eines 48 Stunden alten subkutanen Implantats. Die ausgezogene Gerade entspricht der mittleren Silberkorn-dichte. Die beiden gestrichelten Linien bezeichnen die Toleranzgrenzen gemäss der 3-Sigma-Regel für die Werte der ausgezogenen Geraden.

$M_x = 309 \text{ Vol.E.}$; $M_y = 16 \text{ Ag-Körner}$; $r = +0,44$ (Zufallhöchstwert $+0,33$); R (für Vol.E.) $= +0,018$.



Abb. 9:

- A: Volumensverteilungen von je 100 ^3H -Thymidin-markierten (—) und unmarkierten (---) Zellkernen aus der Innenzone eines 48 Stunden alten subkutanen Implantats, dargestellt nach HINTZSCHE (vgl. Abb. 8). Die Gipfelhöhen der markierten und unmarkierten Kerne sind nicht unmittelbar vergleichbar, da der Markierungsindex bei 13 % liegt.
- B: Die entsprechende Verteilungskurve der Ag-Kornzahlen (Zahl der Kerne gleicher Silberkornzahl), dargestellt nach HINTZSCHE.

48 Stunden alten subkutanen Implantats wurden die Beziehungen zwischen Körnchenzahl und Fläche korrelationsstatistisch geprüft, d.h. der Korrelationskoeffizient und der Regressionskoeffizient berechnet.

Der Korrelationskoeffizient dient zur Messung der Stärke eines geradlinigen Zusammenhangs zwischen zwei Veränderlichen. Er kann zwischen +1 und -1 liegen; $r = 0$ bedeutet Unabhängigkeit, $r = 0$ gleichsinnige und $r = 0$ gegen-sinnige Beziehung der Grössen.

Formel (als Summenformel):

$$r = \frac{\sum (x_i - M_x) (y_i - M_y)}{\sqrt{\sum (x_i - M_x)^2 \cdot \sum (y_i - M_y)^2}}$$

Zeichen: x_i, y_i : veränderliche Messwerte; M_x und M_y : Mittelwerte.

Ergebnis: $r = +0,48$

Die Steigung der Geraden, die sich den Messpunkten am besten anpasst, ist durch den Richtungs(Regressions)-Koeffizienten R gegeben. Er lässt sich nach der Formel

$$R = \frac{\sum (x_i - M_x) \cdot (y_i - M_y)}{\sum (x_i - M_x)^2}$$

ermitteln. Die Gerade mit der Richtung R wird durch den Schwerpunkt des Punktesystems mit den Koordinaten M_x und M_y gelegt und lässt sich am einfachsten nach $(y - M_y) = R \cdot (x - M_x)$ zeichnen. Der Fehlerbereich für den Korrelationskoeffizienten r wurde den KOLLERSchen Tafeln (50) entnommen.

Der Toleranzbereich für die Regressionsgerade lässt sich folgendermassen (78) berechnen:

Formel:

$$s_{y \cdot x}^2 = s_y^2 (1 - r^2) \frac{n-1}{n-2}$$

$$s_T = s_{y \cdot x} \sqrt{1 + 1/n + (x - M_x)^2 / S_x}$$

Toleranzgrenzen für die Regressionsgerade:

$$M_y + R (x - M_x) \pm t_3 \cdot s_T$$

Zeichen: x unabhängige, y abhängige Variable; n Anzahl der Einzelwerte;
 s^2 Varianz; S_x Summe der quadratischen Abweichungen $(x - M_x)^2$.

Um zu prüfen, ob sich Unterschiede im Ergebnis zeigen, wenn die Körnchenzahl mit der primär gemessenen Kernanschnittfläche oder mit dem errechneten Volumen in Beziehung gebracht wird, wurden in einem zweiten Rechengang Volumen und Ag-Kornzahl korreliert. Erwartungsgemäss ergab sich mit einem $r = +0,44$ kein wesentlicher Unterschied. Die Differenz lässt sich wahrscheinlich durch den Einfluss der Umrechnung von der Fläche auf das Volumen erklären. Eine zwischen Fläche und DNS-Aktivität errechnete Korrelation kann demnach auf für die Beziehung Volumen und Körnchenzahl als gültig angesehen werden, (s.a. BUSANNY-CASPARI (8)). Dies gilt umsomehr, als auch die Silberkornzahl nicht einer in der Fläche verteilten DNS entspricht, sondern der im Volumen enthaltenen und teilweise markierten DNS, wobei allerdings die Fehlerquellen bezüglich der Selbstabsorption (MAURER und PRIMBSCH (60)) zu beachten sind.

Deshalb wurde für den 4 Tage alten Ascites-Tumor (Abb. 10) die Korrelation zwischen Fläche und Ag-Kornzahl berechnet. Es ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $r = +0,5$ mit einem Regressionskoeffizienten von $R = +0,41$. Bei Zugrundelegung des 3-Sigma-Fehlerbereichs spricht nach KOLLER bereits ein Wert von $r = +0,33$ (Zufallshöchstwert) bei 100 Messwerten für positive Korrelation. Mit den hier gefundenen Werten von $r = +0,48$ (4) und $r = +0,5$ ist ein Zusammenhang also statistisch gesichert, die Streuung der Silberkornwerte überschreitet die errechneten Grenzen (gestrichelte Linien in Abb. 8 und 10), in denen gemäss der Drei-Sigma-Regel 99,73 % der Werte liegen müssten, jedoch in mehreren Fällen.

In den Abbildungen 9, 11, 12 und 13 sind die Verteilungskurven für die Volumina und die Körnchenzahlen nach HINTZSCHE gezeichnet, um die Silberkornzahlen und die Maxima der Volumensklassen einander zuzuordnen. Bei dem hier vorliegenden geringen Korrelationsgrad ist es nicht verwunderlich, dass diese Übereinstimmung nicht vollkommen sichtbar ist. Trotzdem fällt die weitgehende Parallelität in der Verteilung der Kurvenmaxima auf. Für die Innenzone des 48 Stunden alten Implantats findet sich sowohl in der Volumens- als auch in der Körnchenverteilungskurve ein Hauptgipfel und ein zweites flacheres Maximum, welches ungefähr auf der Hälfte zur nächsten Regelklasse liegt. Wird der Wert der Hauptklasse halbiert, so findet sich hier noch ein flacher Gipfel, (Abb. 9). Drei Klassen zeichnen sich auch für das Volumen und die Silberkornzahl bei den untersuchten Ascites-Tumoren mit unterschiedlicher Deutlichkeit ab, und zwar jeweils zwei Klassen bei annähernd verdoppelten Volumenswerten mit einem auf der Hälfte dazwischenliegenden Hauptmaximum.



Abb. 10:

Silberkornzahl als Funktion der Kernfläche bei einem Ausstrich eines 4 Tage alten Ehrlich-Ascites-Tumors. Die ausgezogene Gerade entspricht der mittleren Silberkornsdichte. Die beiden gestrichelten Linien bezeichnen die Toleranzgrenzen gemäss der 3-Sigma-Regel für die Werte auf der ausgezogenen Geraden. $M_x = 56,5$ Fl.E.; $M_y = 27$ Ag-Körner; $r = +0,51$ (Zufallshöchstwert $+0,33$); R (für Fl.E.) $= +0,42$.

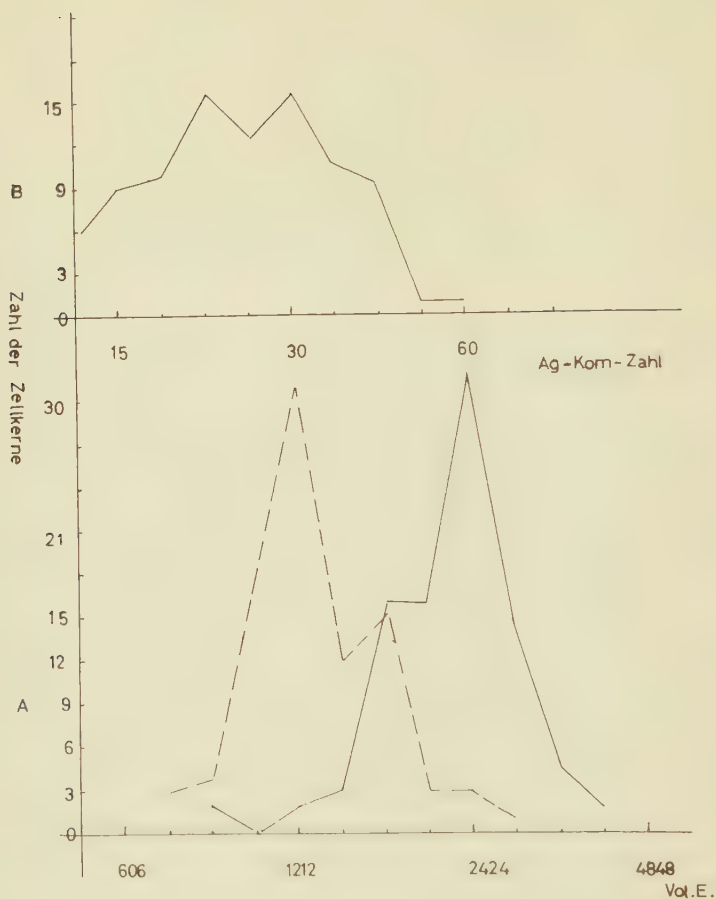


Abb. 11:

- A: Volumensverteilung von je 100 ^3H -Thymidin-markierten (—) und unmarkierten (---) Zellkernen eines 4 Tage alten Ascites-Tumors, dargestellt nach HINTZSCHE, (vgl. Abb.10). Die Höhen der Maxima in beiden Kurven sind nicht unmittelbar zu vergleichen, da der Markierungsindex bei etwa 30 % liegt.
- B: Die entsprechende Verteilungskurve der Ag-Kornzahl (Zahl der Kerne gleicher Silberkornzahl), dargestellt nach HINTZSCHE.



Abb. 12:

- A: Volumensverteilung von 100 Zellkernen eines 48 Stunden alten Ascites-Tumors, dargestellt nach HINTZSCHE.
- B: Die entsprechende Verteilungskurve der Ag-Kornzahl (Zahl der Kerne gleicher Silberkornzahl), dargestellt nach HINTZSCHE.

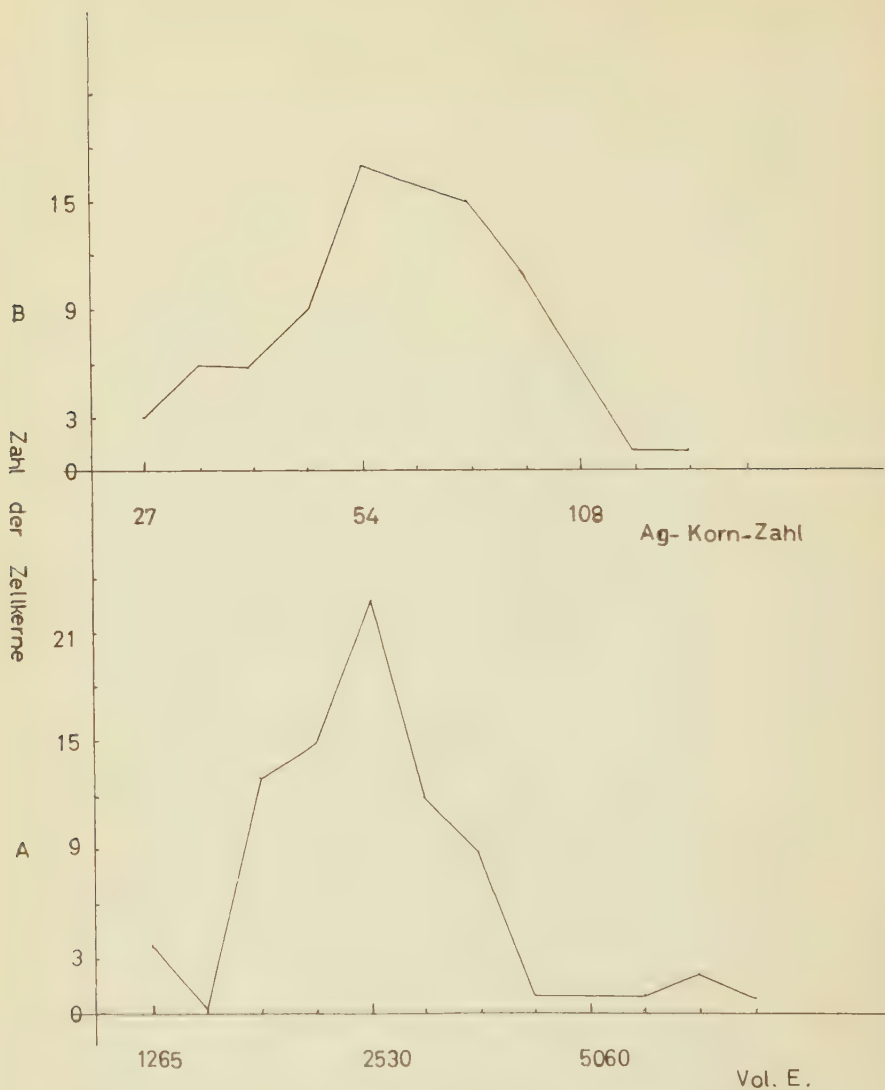


Abb. 13:

A: Volumensverteilung von 100 Zellkernen eines 4 Tage alten Ascites-Tumors, dargestellt nach HINTZSCHE.

B: Die entsprechende Verteilungskurve der Ag-Kornzahl (Zahl der Kerne gleicher Silberkornzahl), dargestellt nach HINTZSCHE.

CARRIERE et al. (9) fanden bei autoradiographischen Untersuchungen an Leberzellen eine praemitotische Kernvergrößerung infolge der DNS-Synthese. Der gleiche Befund liess sich bei dem daraufhin untersuchten subkutanen Implantat (Abb. 9) und einem 4 Tage alten Ascites-Tumor (Abb. 11) nachweisen, bei denen das Volumen von je 100 markierten und unmarkierten Kernen gemessen wurde. In dem subkutanen Implantat wiederholen sich Haupt- und Nebenmaximum, die in beiden Verteilungen etwa gleichweit voneinander entfernt sind, jeweils bei genau dem doppelten Volumenwert. Die Durchschnittswerte für die beiden Volumenverteilungen betragen für die unmarkierten 177, für die markierten 300 Volumeneinheiten. Die Differenz ist nach dem Sigma-Differenz-Test (s.o.) mit $z = 8,3$ statistisch gesichert. Die Mittelwerte von 100 unmarkierten und 100 markierten Tumor-Ascites-Kernen betragen 1200 und 2270 Volumeneinheiten. Dieser Unterschied ist mit $z = 10,9$ nach dem Sigma-Differenztest statistisch gesichert. In diesem Fall findet sich eine genaue Volumenverdoppelung der beiden Hauptgipfel und übereinstimmende Lage der Nebengipfel auf der Hälfte zwischen den Werten der beiden Hauptmaxima. Auch hier deutet sich wieder je ein flacher Vorgipfel an, so dass auch hier zwei Maxima in einem Verdoppelungsrhythmus stehen, während der dritte sich auf der Hälfte zwischen beiden befindet.

IV. Diskussion

Das cytologische Bild des Ehrlich-Mäuse-Ascites-Tumors (EMAT) entspricht dem einer hochvirulenten schnellwachsenden malignen Geschwulst. Die Phase des exponentiellen Wachstums wird dabei mit etwa sechs Tagen angegeben (EDWARDS et al. (17); BASERGA (2)), später soll in zunehmendem Masse ein Teil der Tumorzellen in Nekrose übergehen, die Zahl der DNS-synthetisierenden Zellen nimmt hierbei ab (PATT et al. (65)). Nach intraperitonealer Übertragung findet anscheinend eine Tumorzellselektion statt, wobei die vitalen (jungen) Tumorzellen überleben; aus ihnen entwickelt sich der neue Ascitestumor.

Wie weit verschiedene Wirtstiere Wachstumsdifferenzen bewirken können, bzw. wie weit die Autonomie (BÜNGELER (7)) des in der Ascitesform wachsenden EMAT geht, lässt sich in Abb. 6 ablesen. In diesem Versuch bekommen drei Mäuse ein Ascitestumorgemisch von verschiedenen Tieren intraperitoneal injiziert und wurden 5 Tage post injectionem getötet. Aus der weitgehenden Parallelität im Verlauf der Verteilungskurven geht hervor, dass der Einfluss verschiedener Wirtstiere so gering ist, dass die Ausbildung der Kernklassenverteilung

hiervon nicht beeinflusst wird. Diese Feststellung ist deshalb wesentlich, da sie eine Voraussetzung für alle die Untersuchungen darstellt, in denen Versuchsreihen mit Verwendung und Vergleich verschiedener Wirtstiere durchgeführt wurden.

Wesentliche Veränderungen zeigen sich so beim Vergleich verschieden alter Ascitestumoren (Abb. 7). Besonders bei dem 24 Stunden nach der Überimpfung entnommenen Ascites, ähnlich auch bei den älteren wird deutlich, dass die Kerne sich durchschnittlich verkleinern, und die Maxima sich in die kleineren Volumensklassen verlagern. Die Ursache liegt vermutlich darin, dass viele Kerne der höheren Volumensklassen im 10 Tage alten Ascites, der bereits über die Exponentialphase hinaus ist, nach der Überimpfung zugrunde gehen, die jüngeren, vitaleren sich durch Teilung weitervermehren. Demnach scheinen die älteren Zellkerne ein grösseres Volumen zu besitzen, das sich zumindest teilweise als pathologisches Kernödem (GRUNDMANN (26); FAILLA (18) und STÖCKER (73, 74)) deuten lässt. Dafür sprechen auch die licht- und elektronenmikroskopischen Beobachtungen (HUTH (42); SEEGER (72); PROPST (66)), nach denen die degenerierenden Kerne gross, locker und gelappt erscheinen. Es fällt hier ebenso wie bei den späten Werten der Innenzone auf (Abb. 4), dass die Kernvolumina um bestimmte Werte kumulieren und die vorher sichtbare Gipfelrhythmik sich verwischt. Die Ursache könnte darin liegen, dass sich eine Klasse immer mehr in den Vordergrund schiebt und die anderen zugrunde gehen.

Die Verhältnisse werden komplizierter, wenn der EMAT subkutan als solider Tumor wächst. Wie bereits EDER und WRBA (11, 12, 13) zeigten, differenziert sich kurze Zeit nach der subkutanen Implantation eine grosszellige äussere und eine kleinzellige innere Schicht, wobei die Zeitdauer der Entwicklung zwischen einer und etwa vier Stunden variiert. Abb. 2 und Tabelle 1 lassen erkennen, dass das Durchschnittsvolumen der Zellkerne in der Aussenzone in den vorliegenden Versuchen bereits nach einer Stunde um etwa 46 % (von 290 auf 424 Vol.E.) zugenommen hat. Diese Kernvergrösserung gegenüber dem Ausgangsascites bleibt trotz individueller Schwankung auch in den späteren Untersuchungszeitpunkten immer deutlich ausgeprägt. Sie hat ihre Ursache offensichtlich darin, dass diejenigen Zellen, die bei der Injektion zufällig in engeren Kontakt mit dem Wirtsgewebe und damit unter günstigere Ernährungsbedingungen als im Bauchraum gelangen, mit einer erheblichen Vergrösserung reagieren. Es lässt sich nicht sicher entscheiden, welcher Art dieser Volumensanstieg ist. Denkbar ist ein "funktionelles Kernödem" (GRUNDMANN (23); BENNINGHOFF (5)) infolge stärkerer Hydratation, Vermehrung des Kerneiwassergehaltes oder Erhöhung des Aminosäure-Umsatzes (LEUCHTENBERGER (51); LEUCHTENBERGER und SCHRADER (52)), oder aber infolge eines Anstiegs des DNS-Gehaltes, d.h. durch

Vorgänge im Sinne einer Chromosomen-Endoreduplikation (LEVAN und HAUSCHKA (54)).

Da die Vergrößerung bereits nach einer Stunde deutlich sichtbar wird, lässt sie sich kaum durch eine DNS-Vermehrung erklären, zumindest nicht in den frühen Stadien. Am wahrscheinlichsten erscheint eine Volumenzunahme infolge von Quellung der Kernsubstanzen im Sinne eines funktionellen Kernödems. Die Verantwortung für relative Wasserverschiebungen und Größenveränderungen im Zellkern schreiben ALTMANN und GRUNDMANN (1) den DNS-Histonen und "akzessorischen Substanzen" der Chromosomen, d.h. höheren Eiweisskörpern und Ribonukleoproteiden zu. Die Differenz zwischen den Durchschnittsvolumina der Aussenzone und des Ausgangsascites um 46 % entspricht annähernd dem Faktor $\sqrt{2} = 1,41$ und damit einer Oberflächenverdoppelung (GAUER (20)) der Aussenzonenkerne gegenüber denen des Ausgangsascites. Das ist deshalb auffällig, weil jeder Zellkern unter gesteigerter funktioneller Beanspruchung sich soweit vergrößern kann, dass seine Oberfläche sich verdoppelt (HERBST und HERTWIG (nach 20)). Diese Relation ist in den späteren Werten teilweise nicht mehr so gut nachweisbar, obwohl die durchschnittlichen Volumina der Aussenzonenkerne immer weit über denen des Ausgangsascites bleiben.

Die Gründe hierfür dürften in den regressiven Veränderungen zu suchen sein, die sich besonders nach 48 Stunden auch in den inneren Bezirken der Aussenzone bemerkbar machen. Für die Interpretation der Volumenzunahme in der Aussenzone durch funktionelles Kernödem spricht auch die Tatsache, dass die Kernvolumina erheblich zunehmen können ohne dass sich die Verteilungskurve in ihren Proportionen wesentlich ändert, wie es Abb. 3 bei einem 22 Stunden alten subkutanen Implantat demonstriert.

Die demgegenüber in der Innenzone auftretende Kernverkleinerung ist sehr viel schwieriger zu erklären, der Schwerpunkt der Untersuchungen liegt deshalb bei den hierbei auftretenden Veränderungen. Wie bereits von EDER und WRBA (11, 12, 13) beobachtet wurde, sind die hierbei auftretenden Zellveränderungen nicht nur als Nekrobiose, d.h. als Vorstadien der Nekrose aufzufassen, sind doch vollkommen intakte Zellen in der Innenzone in Einzelfällen noch 10 Tage nach der Implantation nachweisbar. Es erschien daher notwendig, die mikroskopisch beobachteten Veränderungen an den Zellkernen durch Messungen zu objektivieren und dadurch näher aufzuschlüsseln.

Wie die Ergebnisse zeigen (Abb. 2 und Tabelle 1), ist die zu den frühesten

Untersuchungszeitpunkten nach subkutaner Implantation erkennbare Differenzierung in Aussen- und Innenzone zuerst durch eine Vergrösserung der Zellen in der Aussenzone bedingt, denn die Zellkerne der Innenzone entsprechen zu dieser Zeit weitgehend dem Ausgangsascites. Die danach einsetzende Zellkernverkleinerung in der Innenzone schreitet bis 48 Stunden nach subkutaner Implantation fort.

Auffälligerweise streuen die Volumina der Innenzone in einem sehr engen Bereich, so dass innere oder äussere Anteile der Innenzone, gemessen an den Kerngrössen, keine wesentlichen Unterschiede aufweisen. Im Bereich der makroskopisch sichtbaren Grenze zwischen Aussen- und Innenzone zeigen die Kernmessungen, dass kein kontinuierlicher Übergang mit langsam zunehmender Kernverkleinerung zwischen beiden Zonen besteht, sondern die Kerngrössen steil abfallen. Wenn der Schwellenwert der Grenzschichtdicke einmal überschritten ist, d.h. in der Innenzone, spielen Diffusionsgradienten keine Rolle mehr. Dass diese Zellen lange Zeit unter den reduzierten Bedingungen im Sinne einer *vita minima* lebensfähig bleiben können, haben die Umlagerungsversuche von WRBA und EDER (80) gezeigt und liess sich ebenso durch Umlagerung einer Lufttasche demonstrieren. Auffällig bei den in Tabelle 1 wiedergegebenen Messwerten ist eine zwischenzeitliche Zunahme der Kernvolumina zwischen 48 Stunden und 4 Tagen. Da diese Veränderungen zeitlich mit weniger auffälligen Volumenschwankungen in der Aussenzone, vor allem aber mit der nunmehr beginnenden Kapillarisation zusammenfallen, hängen sie möglicherweise mit der besseren Diffusion ernährender Stoffe vom Wirtsgewebe zusammen.

Nicht nur mikroskopisch gleichen sich die Mehrzahl der Zellkerne in den Lufttaschen und die der Innenzone im subkutanen Implantat, sondern auch die hier gefundenen Volumenwerte (Abb. 5) entsprechen denen der Kerne in der Innenzone 24 Stunden nach Überimpfung. Die Bindegewebskapsel hat offenbar eine so starke Stoffwechselbeeinträchtigung zur Folge, dass in der Aussenzone vergleichbare Kernvergrösserungen nur da gefunden werden, wo Zellen mit der Ascitesflüssigkeit in das Bindegewebe abgepresst worden sind bzw. engen Kontakt mit der Membran haben, oder wo Zellen bei der Injektion am Stichkanal liegengeblieben sind. Das Alter der Kapseln, d.h. die Zeit nach der ersten Luftinjektion, spielt dabei keine Rolle mehr, sobald die Bindegewebsmembranen voll entwickelt sind.

Diese Befunde sind ein weiterer Hinweis für die Abhängigkeit der Kernverkleinerung von der Diffusion stoffwechselunterhaltender Faktoren aus dem Wirtsgewebe.

Um den Mechanismus der Kernverkleinerung näher aufzuschlüsseln, wurden die Volumenverteilungen in verschiedenen Zeitabständen nach der Implantation ermittelt (Abb. 4). Wie sich bereits aus dem Verhalten der Mittelwerte ablesen liess (Abb. 2 und Tab. 1) verschieben sich die Volumina um so mehr in den Bereich kleinerer Volumensklassen, je länger die Zellen den ungünstigen Bedingungen der Innenzone unterworfen sind. Wie oben besprochen, liegt bereits im Ausgangs-Ascites ein Gemisch von Zellkernen verschiedener Grössen vor, wobei sich bestimmte Volumina zu Klassen häufen (Abb. 4).

Während zu früheren Untersuchungszeitpunkten Maxima auch noch bei den grösseren Volumensklassen zu finden sind, verlagern sie sich später immer mehr in den Bereich des ersten Hauptmaximums im Ausgangs-Ascites (160 Vol. E.). Daneben bilden sich neue Maxima bei niedrigen Volumensklassen aus, die im Ausgangs-Ascites noch nicht vorhanden sind. Trotzdem erscheint noch nach sechs Tagen an der Stelle des zweiten Hauptmaximums des Ausgangs-Ascites (320 Vol. E.) ein kleiner Gipfel. Zur Interpretation dieser Befunde wurden vergleichende karyometrische und autoradiographische Untersuchungen durchgeführt, deren Besprechung zu ihrem Verständnis notwendig ist.

Bei diesen Vergleichen wurde eine statistisch signifikante Korrelation zwischen Fläche des Kernanschnitts bzw. Kernvolumen und Silberkornzahl errechnet. Obwohl diese hier nur für ein subkutanes Implantat und einen vier Tage alten Ascites Tumor nachgewiesen wurde, besteht kein Anlass, an dem Vorhandensein dieser Beziehung auch bei den anderen Tumoren zu zweifeln, da die Silberkorndiagramme ein sehr ähnliches Bild zeigen. Dabei erwies es sich als bedeutungslos, ob die Körnchenzahl mit der Fläche des Kernanschnitts oder mit seinem Volumen korreliert wurde.

Wie aus den Abbildungen 8 und 10 hervorgeht, streuen die Silberkornzahlen in einem breiten Bereich und überschreiten mit einigen Werten die errechneten Toleranzgrenzen (99, 73 %). Für die breite Streuung kommen eine Reihe von Ursachen in Frage:

Die Methoden der Volumenmessung und der Körnchenzählung sind mit erheblichen, aber ungleich grossen Fehlern behaftet. Bei dem umständlicheren Weg (siehe Methode) der Volumenmessung können sich wesentlich häufiger Fehler einschleichen und sich potenzieren als bei der direkten Körnchenzählung.

In den Ausstrichen bewirkt die unterschiedliche Schrumpfung und die verschiedenen dicke Zytoplasmaschicht über dem Kern, und damit die Variation der Selbstabsorption unreaale Differenzen der Körnchenzahlen (KOBURG und MAURER

(49); PAINTER et al. (64)). Wesentlich ist die endliche Verfügbarkeitszeit des H³-Thymidins von maximal einer Stunde, dadurch kann ein Zellkern, der sich gerade am Ende seiner Synthesephase befindet, nur einen Bruchteil der Verfügbarkeit ausnutzen. Hinzu kommt, dass die Syntheserate im Kern nicht linear von der Zeit abhängig zu sein scheint (PAINTER, DREW und GIAUCQUE (64)). HOWARD und DEWEY (38) fanden bei autoradiographischen Untersuchungen an *Vicia faba* Anzeichen für eine schnelle Thymidininkorporation am Anfang, eine langsamere im Mittelteil und eine wieder beschleunigte am Ende der Synthesephase. Die Erklärung dafür können Befunde von LIMA DE FARIA (55) aus Untersuchungen an *Melanopus* und *Secale* und von TAYOR (70) an Zellkulturen des Goldhamsters liefern. Beide fanden, dass sich verschiedene Chromosomenabschnitte in unterschiedlichen Phasen der Syntheszeit verdoppeln. Nach LIMA DE FARIA nimmt das Heterochromatin später als das Euchromatin, aber die drei- bis vierfache Menge an Aminosäuren auf. Es ist daher der Fall denkbar, dass bei einem Teil der Kerne die Synthese des Heterochromatins mit der Verfügbarkeitszeit des H³-Thymidins zusammenfällt, bei anderen dagegen gerade die weniger intensive Synthese des Euchromatins während der Verwertungszeit aktiv sind. Die sich daraus ergebenden Differenzen in der Markierungintensität zwischen an sich gleichwertigen Kernen liegen auf der Hand und begrenzen die Zuverlässigkeit bei vergleichenden Messungen zwischen Volumen und DNS-Aktivität. Welche von diesen Mechanismen auch beim EMAT wirksam sind, lässt sich nicht sicher entscheiden.

Trotz der erheblichen Fehlerquellen liess sich ein Zusammenhang zwischen Volumen und Ag-Kornzahl nachweisen. Da die Silberkornzahl den DNS-Gehalt und damit die Chromosomenausstattung eines Kern repräsentiert, besteht also eine Korrelation zwischen Volumen und Plloidiestufe. Dieses Ergebnis bestätigt die Befunde von TIMONEN (76) an normalem und carcinomatös veränderten Endometrium, CARRIÈRE, LEBLOND und MESSIER (9) und BUSSANNY-CASPARI (8) an Leberzellen und GRUNDMANN (25) an Lymphknoten nach Stick-Joll-Lost-Therapie, wobei er eine Rhythmik in der Volumenverteilung, Vor-gipfel sowie Änderung der Gipfelhöhen in den einzelnen Klassen auf quantitative Differenzen des Chromatinbestandes zurückführte.

Aus den Abbildungen 9, 11 und 12, 13 geht hervor, dass sich bei den einzelnen untersuchten Tumoren die Verteilungskurven für Volumen und Ag-Kornzahl mit unterschiedlicher Genauigkeit entsprechen. Bei dem hier vorliegenden schwachen Korrelationsgrad darf es nicht wundern, wenn die Parallellität nicht deutlicher wird. Mit ausreichender Sicherheit lassen sich jedoch bei allen hier vorliegenden Tumoren drei Maxima, zwei Haupt- und ein Nebenmaxima, unterscheiden,

die sich bei den Ascitestumoren besser erkennen lassen als bei der Innenzone des subkutanen Implantats. In keinem Fall liegen weder in den Silberkorn- noch in den Volumenskurven zwei benachbarte Maxima bei verdoppelten Klassen, sondern sie stehen im Verhältnis 1 : 1,5 bzw. 1,7. Nach den Ergebnissen von BAYREUTHER (4) und anderen Untersuchern (68) herrschen im Sinne der mehrfach bestätigten stem-cell-Theorie (37, 39, 40) in dem hier verwendeten EMAT bei breit streuender Aneuploidie Kerne mit hyperdiploidem und tetraploidem Chromosomensatz vor.

Es liegt nahe, die Volumen- und DNS-Maxima als Ausdruck der verschiedenen Ploidiestufen zu deuten, zumal die oben angegebenen Proportionen, in denen die Maxima zueinander stehen, dazu passen würden. Dann würde der erste Hauptgipfel den hyperdiploiden, der zweite den tetraploiden Kernen entsprechen. In dem ersten breit streuenden Maximum wären dann die diploiden bzw. hyperhaploiden Zellkerne zu suchen. Ein sicherer Beweis für die Berechtigung dieser Überlegung lässt sich mit den hier angewandten Methoden jedoch nicht erbringen.

Bei der Gegenüberstellung der Volumenverteilungen von markierten und unmarkierten Zellkernen der 48 Stunden alten Innenzone und des vier Tage alten Ascites ist bemerkenswert, dass sich bei annähernd genauer, mit dem Sigma-Differenz-Test gesicherter Verdoppelung der mittleren Volumenwerte die Maxima der markierten Kerne bei exakt verdoppelten Volumensklassen ausbilden. Dies legt die Vermutung sehr nahe, dass die Tumorzellen während der DNS-Synthese ihr Volumen verdoppeln.

Entsprechende Befunde erhoben CARRIERE und LEBLOND (9) bei autoradiographischen Untersuchungen an Leberzellen, bei denen sie ebenfalls eine prämitotische Kernvergrößerung infolge der DNS-Synthese feststellen. Diese blieb aber um mehrere Stunden hinter dem DNS-Zuwachs zurück, so dass CARRIERE und LEBLOND die Grössenzunahme auf die durch die DNS-Vermehrung induzierte RNS- und Proteinzunahme zurückführten. Dagegen steigen anscheinend bei den hier untersuchten Ehrlich-Carcinom-Zellkernen die Volumina gleichzeitig mit der Synthese an. Es bleibt allerdings zu erwägen, ob die Vergrößerung infolge der DNS-Synthese nur vorgetäuscht wird, tatsächlich aber nur primär grosse Kerne synthetisieren. Das ist jedoch deshalb unwahrscheinlich, weil dann die überwiegende Mehrzahl der Zellen, nämlich die kleineren, durch eine amitotische Halbierung ihres DNS-Bestandes bzw. Kernvolumens entstehen müsste.

Die hier vorliegenden Befunde lassen demnach nur den Schluss zu, dass die

DNS-Synthese ohne zeitlichen Verzug einen prämitotischen Volumensanstieg induziert und das Anwachsen des DNS-Bestandes auf den der doppelten Ploidie-stufe mit einer Verdoppelung des Volumens verknüpft ist.

Nicht nur bei den autoradiographisch, sondern auch in den übrigen hier unter-suchten Ascitestumoren sind mindestens drei Maxima zu erkennen (Abb. 3, 4 , 5 und 6), auch wenn diese nicht immer völlig gleiche Proportionen zueinander aufweisen. Die Ursachen für diese Unterschiede liegen vor allem in der Tatsache, dass die drei Klassen bei markierten Kernen beobachtet wurden, d.h. solchen, die sich gerade während der einstündigen Verfügbarkeitszeit des ^3H -Thymidins in ihrer Synthesephase befinden. Die Gesamtpopulationen sind jedoch komple-xer zusammengesetzt. Deshalb darf es nicht wundern, wenn sich teilweise mehr als drei Volumensklassen andeuten, für die nicht immer sichere Relationen nachweisbar sind.

Eine mit der Kernklassenverteilung des Ascitestumors vergleichbare Klassenbil-dung ist auch bei den zu verschiedenen Zeitpunkten untersuchten Innenzonen-kernen erkennbar (Abb. 4). Je länger die Innenzonen jedoch bestehen, desto mehr kumulieren die Kernvolumina in einem engen Bereich mit breiter Streuung, wobei sich auch hier noch Maxima in Form von Stufen oder Plateaus andeuten. Ähnliche Erscheinungen finden sich am Tumoraszites, wenn die Phase des ex-pontiellen Wachstums überschritten ist (Abb. 7).

Für die Volumenverschiebungen bei den Kernen der älteren Innenzonen in nie-drige Werte, unter gleichzeitiger Erhaltung bestimmter Gipfelklassen sind ver-schiedene Mechanismen denkbar: Die gesamte Zellpopulation kann infolge physikalisch-osmotisch bedingter Entquellungsvorgänge in kleinere Volumens-klassen verschoben werden. Als Verantwortliche für Unterschiede im Hydra-tationsgrad und für eine Volumensabnahme durch Entquellung kommen nach ALTMANN und GRUNDMANN (1) die DNS-Histone und "akzessorische Substan-zen" im Kern in Betracht. So konnte z.B. BENNINGHOFF (5) beim Frosch Kern-schrumpfungen um 60 % durch Wasserabgabe beobachten. Nach anderen Befun-den (LEUCHTENBERGER (51); LEUCHTENBERGER und SCHRADER (52)) geht in den frühen Pyknosestadien von subkutan und solid wachsenden Mäuse-Tumor-zellen die Verkleinerung der Zellen mit einem Proteinverlust aus dem Kern einher. Für eine Volumensverminderung aus diesen Gründen spricht ein Ver-gleich der Verteilungskurven für die Kernvolumina des Ausgangs-Ascites und der 22 Stunden alten Innenzone (Abb. 3). Hier scheinen die Volumina der In-nenzonenkerne in nahezu konstanten Proportionen in kleinere Werte verschoben zu sein, wobei einzelne Maxima bei genau halbierten Werten wiederzufinden

sind.

Die zweite Möglichkeit besteht darin, dass die grossen Volumensklassen verschwinden, entweder durch Untergang der grossen und relative Zunahme der kleineren Zellen, oder durch amitotische Halbierung des Chromosomensatzes und des Volumens, so dass die Volumensklassen der höheren Werte abnehmen und sich die zunächst kleineren Gipfel bei den annähernd halbierten Werten erhöhen.

Drittens könnte es bedeutungsvoll sein, dass in den späten, in zunehmendem Masse der Nekrobiose verfallenden Stadien der Innenzone die DNS-Synthese mehr und mehr herabgesetzt wird, so dass die Kerne infolge mangelnder Synthese nicht mehr auf ein grösseres Volumen anwachsen.

Welcher dieser Vorgänge die Volumensabnahme im wesentlichen bewirkt, lässt sich nicht sicher entscheiden. Die Grössenverschiebungen zwischen Ausgangs-Ascites sowie Innen- und Aussenzone (Abb. 3) vermitteln den Eindruck, dass die Grössenveränderungen durch eine bei allen Zellen proportionale Wasser- oder Proteinverschiebung bewirkt wird. Aus der Art der Gipfelwanderungen und der konstanten Lage einzelner Maxima lässt sich jedoch schliessen, dass keine schleichende Verkleinerung stattfindet, wie sie bei ausschliesslicher Wirkung unterschiedlicher Hydratation zu erwarten wäre, sondern dass daneben einer der oben erwähnten Mechanismen, sicher jedenfalls der Rückgang der DNS-Synthese, eine wesentliche Rolle spielt. Indirekt spricht dafür auch die Höhe des zweiten Maximums in den Verteilungskurven der Tumor-Asciten (Abb. 3 und 4), aus denen sich schliessen lässt, dass neben den primär grösseren Kernen auch die infolge der DNS-Vermehrung auf doppeltes Volumen angewachsenen Zellkerne kleinerer Grundklassen in ihm kumulieren.

Von besonderem Interesse sind hier Untersuchungen von LEUCHTENBERGER (51). Aus ihnen geht hervor, dass die Pyknose von Zellkernen in subkutanen Tumorknoten durch Reduktion des Volumens, Wasserverlust, Schwund von Protein und Depolymerisation der DNS eingeleitet wird. Proteine und depolymerisierte DNS gehen hierbei dem Kern fortlaufend weiter verloren, so dass das Verhältnis zwischen Gesamtprotein und polymerisierter DNS im Zellkern immer gleich bleibt.

Bei der engen Koppelung von Protein- und DNS-Gehalt im Kern ist die Vermutung von LEUCHTENBERGER und SCHRADER (52) naheliegend, dass die Proteinsynthese selber ein rhythmischer Prozess sei. So liesse sich die diskontinuierliche Änderung des Kernvolumens vielleicht durch eine sprunghafte Abnahme des

Proteins erklären.

Trotz der erheblichen Kernvolumensverminderung, die auf diese oder jene Art wahrscheinlich mit einem Substanzverlust verbunden ist, überleben die Zellen in dem Mangelmilieu der Innenzone lange Zeit im Sinne einer *vita minima*, wobei sie ihre Wachstumspotenzen behalten.

Sowohl in experimentellen als auch in menschlichen Tumoren sind Zellen beschrieben worden, die den kleinen Zellen der Innenzone gleichen. BORST (6) fand Kleinzellen in der Peripherie von Nekrosen und vermutete, dass sie daraus Zerfallsmaterial für ihren Stoffwechsel verwenden. Er sah in ihnen Dauerformen, die durch eine degenerative amitotische Zellteilung entstanden sein könnten. Tumorzellen können Makromoleküle (WRBA (80)) und grössere Fragmente zerfallener Zellen (RYSER und CAULFIELD (69)) in ihren Stoffwechsel einbeziehen, so dass GRAHAM (21) von "kannibalischer" Autophagie der Tumorzellen spricht. Aus autoradiographischen Untersuchungen von EDER, WRBA und MUTH (15) geht hervor, dass das gleiche Phänomen auch für markierte DNS in der Innenzone von subkutanen EMAT-Implantaten zu beobachten ist.

HÖRA (33) fand die Kernvolumina in Geschwulststückchen des Brown-Pearce-Tumors verkleinert, wenn er sie in "Filtersäckchen bekannter Porengrösse" implantierte. Reimplantation der so erzeugten "Borst'schen Kleinzellen" unter normalen Verhältnissen ergab einen normalen Tumor. HÖRNER (34) erzielte Kleinzellen, wenn er Ehrlich-Ascites-Tumoren in CO₂ und flüssiger Luft unterkühlte. Während HACKMANN (27) die Verkleinerung von Tumorzellen ausschliesslich für eine Degenerationserscheinung hält, deuten HÖRA und HÖRNER die Kleinzellen als Resistenzformen gegen widrige oder mangelhafte Umgebungsbedingungen und kommen in Übereinstimmung mit den hier vorliegenden Befunden zu dem Schluss, dass die Entwicklung zu Kleinzellen keine Veränderung darstellt, die unwiderruflich zum Verlust der Vitalität führen muss.

Die für die menschliche Geschwulstpathologie bedeutungsvollen sogenannten Spätrezidive gehen möglicherweise von solchen Zellen aus, die unter den Bedingungen einer *vita minima*, aber mit voller Wachstumspotenz "geschlummert" (DRUCKREY, HAMPERL und andere (10) haben.

Damit gewinnen die hier an Modell des Ehrlich-Mäuse-Ascites-Tumor durchgeführten Analysen der Umgestaltungsvorgänge im Hinblick auf diese für die Geschwulstpathologie des Menschen entscheidende Frage ihre Bedeutung.

V. Zusammenfassung

Die in subkutanen Implantaten des Ehrlich-Ascites-Tumors zwischen einer und vier Stunden nach Überimpfung auftretende Schichtung in eine grosszellige Aussen- und eine kleinzellige Innenzone wird in zeitlich gestaffelter Reihenfolge untersucht. Nach Fixation nach Zenker und Färbung nach Feulgen werden die Kernvolumina bestimmt und die Grössenunterschiede statistisch analysiert. Die Untersuchungen wurden an insgesamt 40 Mäusen des NMRI-Stammes durchgeführt und dabei die Volumina von insgesamt 7230 Zellkernen bestimmt.

Es zeigt sich, dass die Grössenunterschiede zwischen der grosszelligen Aussen- und der kleinzelligen Innenzone statistisch signifikant sind, wobei die Kernverkleinerung in der Innenzone mit zunehmendem zeitlichem Abstand von der Implantation deutlicher wird.

Die Kernverkleinerung vollzieht sich dabei nicht kontinuierlich; es lassen sich zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten in den Volumensverteilungskurven Gipfelverteilungen mit ähnlichen Proportionen und Volumensmaxima bei den gleichen Werten nachweisen.

Analoge Zellkernveränderungen finden sich in bindegewebig abgekapselten subkutanen Lufttaschen (check-pouch nach Selye).

Die Entwicklung zu Kleinzellen in der Innenzone des subkutanen Implantats und in den Lufttaschen wird auf eine diffusionsabhängige Stoffwechselbegrenzung zurückgeführt. Da die Lebensfähigkeit dieser Kleinzellen lange erhalten bleibt, können sie nicht ausschliesslich als Zeichen fortschreitender Degeneration gedeutet werden.

Kernmessungen an luftgetrockneten und mit Hämalaun gefärbten Ausstrichen des Ehrlich-Ascites-Tumors ergaben, dass bei intraperitonealem Wachstum, zumindest während der Exponentialphase, verschiedene Wirtstiere nur geringe Wachstumsdifferenzen bewirken.

Unterschiede finden sich bei der Untersuchung von Ehrlich-Ascites-Tumoren verschiedenen Alters in Form von Kerngrössen- und Kernklassenveränderungen.

In vergleichenden karyometrischen und autoradiographischen Messungen an ^3H -Thymidin-markierten Zellkernen der Innenzone eines subkutanen Implantats und drei Ascites-Tumoren ergab sich ein statistisch signifikanter Anstieg

der synthetisierenden Zellkerne auf etwa das doppelte Volumen.

Zwischen Zellkerngrösse und Silberkornzahl wurde eine statistisch signifikante Korrelation errechnet.

Die Kernklassen, die sich sowohl in den Körnchen- als auch in den Volumensverteilungskurven der markierten Kerne darstellen, finden sich in ähnlicher Form auch bei den übrigen Volumensverteilungen.

Die am Ehrlich-Mäuse-Ascites-Tumor analysierte Entwicklung von lange regenerationsfähigen Kleinzellen erscheint als Modell für Metastasierungsvorgänge der menschlichen Geschwulstpathologie bedeutungsvoll.

VI. Literatur

- 1 ALTMANN, H.-W. und E.GRUNDMANN:
 Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen über die Vital-
 struktur tierischer Zellkerne.
 Beitr. pathol. Anat. 115, 313 (1955)
- 2 BASERGA, R.:
 The Kinetics of Growth of the Ehrlich Tumor.
 Arch. Pathol. 76, 9, (1963)
- 3 BASERGA, R.:
 Mitotic Cycle of Ascites Tumor Cells.
 Arch. Pathol. 75, 156 (1963)
- 4 BAYREUTHER, K.:
 Der Chromosomenbestand des Ehrlich-Ascites-Tumors der
 Maus.
 Zschr. Naturforschg. 7b, 554 (1952)
- 5 BENNINGHOFF, A.:
 Funktionelle Kernschwellung und Kernschrumpfung.
 Anat. Nachr. 1, 50 (1960)
- 6 BORST, M.:
 Kleinzellen in Tumoren. Ein Betrag zur Frage der zellfreien
 Geschwulstentstehung.
 Zschr. Krebsforsch. 44, 145 (1936)
- 7 BÜNGELER, W.:
 Geschwülste und regulierte abhängige Wachstumsstörungen
 (Hyperplasien) im Rahmen der Cellular- und Regulations-
 pathologie.
 Zschr. Krebsforsch. 58, 72 (1951/52)
- 8 BUSANNY-CASPARI, W.:
 Autoradiographische Untersuchungen mit H^3 -Thymidin über
 die DNS-Synthese in Leberzellen verschiedener Ploidiestufen.
 Frankf. Zschr.f.Pathol. 72, 123 (1963).
- 9 CARRIERE, R., C.P.LEBLOND und B.MESSIER:
 Increase of the Size of Liver Cell Nuclei before Mitosis.
 Exp. Cell Res. 23, 625 (1961)

- 10 DRUCKREY, H., H.HAMPERL, H. HERKEN und B. RAREI:
Chirurgische Behandlung von Tiergeschwülsten.
Zschr. Krebsforsch. 48, 451 (1939)
- 11 EDER, M. und H.WRBA:
Fermenthistochemische Untersuchungen zur Biologie von
Ascites-Tumoren und ihrer Umwandlung in solide Ge-
schwülste.
Zschr. Krebsforsch. 64, 353 (1961).
- 12 EDER, M., H.WRBA und U.LÖHRS:
Topographisch abhängige Kerngrößenveränderung in der
Frühphase von Implantationstumoren.
Naturwissensch. 49, 450 (1962)
- 13 EDER, M. und H.WRBA:
Veränderungen der Kerngrößen und der DNS-Synthese bei
der Entwicklung solider Geschwülste aus Ascites-Tumorzellen.
Zschr. Krebsforsch. 65, 309 (1963)
- 14 EDER, M. und H.WRBA:
Zur Biologie der Umwandlung von Ascitestumoren in solide
Geschwülste.
Naturwissensch. 49, 304/305 (1962)
- 15 EDER, M. H.WRBA und H.H. MUTH:
Autoradiographische Untersuchungen zum Nukleinsäurestoff-
wechsel bei der Umwandlung von Ascites-Tumoren.
Naturwissenschaft. 50, 46 (1963)
- 16 EHRLICH, P.:
Experimentelle Studien an Mäusetumoren.
Zschr.Krebsforsch. 5, 59 (1907)
- 17 EDWARDS, J.L., A.L.KOCH, P.YOUCIS, H.L.FREESE, M.B.LAITE and
J.Th.DONALSON:
Some Chyracteristics of DNA Synthesis and the Mitotic
Cycle in Ehrlich Ascites Tumor Cells.
J.Biophys. Biochem. Cytology 7, 273 (1960)
- 18 FAILLA, G. :
Some Aspects of the Biological Actions of Ionizing Radiation.
Amer. J. Roentg. 44, 649 (1940)

- 19 GALL, J.G. and W.W.JOHNSON:
Is there "Metabolic" DNA in the Mouse Seminal Vesicle?
Biophys. Biochem. Cytol. 7, 657 (1960)
- 20 GAUER, I-P.:
Kerngrößenuntersuchungen an Übergangsepithel.
Ein Beitrag zum Studium der Amitose.
Mitt.Naturf.Gesellsch. Bern 6, 85 (1949)
- 21 GRAHAM, G.S.:
The Cancer Cells of Serous Effusions.
Amer.J.Pathol. 9, 701 (1933) (zitiert nach Hamperl)
- 22 GRUNDMANN E. und P.STEIN:
Untersuchungen über die Kernstruktur in normalen Geweben
und im Carcinom.
Beitr.Pathol. Anat. 125, 54 (1961)
- 23 GRUNDMANN, E., H.G.HILLEMANNs und K.RHA:
Cytoplasmatische Untersuchungen am menschlichen
Portioepithel während der Krebsentstehung.
Zschr.Krebsforsch. 64, 390 (1961)
- 24 GRUNDMANN, E.:
Beiträge zur Krebsentstehung in der Rattenleber an Hand
mikrophotometrischer Messungen.
Verh.Dtsch.Ges.Pathol. 38 Tagg., 362 (1955)
- 25 GRUNDMANN, E.:
Karyologische und karyometrische Untersuchungen an
Lymphknoten-Punktaten bei Stickstoff-Lost-Therapie.
Zschr.exp.Med. 118, 489 (1952)
- 26 GRUNDMANN, E.:
Histologische Untersuchungen über die Wirkungen experimen-
tellen Sauerstoffentzugs auf das Katzenherz.
Beitr. Pathol. Anat. 111, 36 (1951)
- 27 HACKMANN, Chr.:
Experimentelle Studien über Heilungsvorgänge bei bösartigen
Geschwülsten.
Zschr.Krebsforsch. 57, 164 (1950)

- 28 HAMPERL, H.:
Hdbuch Allgem.Pathol. VI/3, 18 (1956)
- 29 HAUSCHKA, T.S.:
Distinct Clonal Derivatives of the Krebs-2-Mouse-Ascites
established through Transplantation of Single Cells.
Proc.Amer.Ass.Cancer Res. 1, 24 (1953) (zitiert nach
Hamperl)
- 30 HAUSCHKA, T.S. and A.LEVAN:
Characterisation of Five Ascites Tumors with Respect to
Chromosome Ploidy.
Anat. Rec. 111, 467 (1951)
- 31 HEIBERG, K.A.:
Verhalten des Kernplasmas als Bindeglied zwischen Ent-
zündung und Geschwulstbildung.
Zschr.Krebsforsch. 30, 60 (1929)
- 32 HINTZSCHE, E.:
Statistische Probleme aus der Kerngrössenforschung.
Experientia I/4, 103 (1945)
- 33 HÖRA, J.: Untersuchungen über das Schicksal von Borstchen Klein-
zellen im Brown-Pearce-Tumor.
Zschr.Krebsforsch. 52, 1 (1942)
- 34 HÖRNER, O.:
Experimenteller Beitrag zur Frage der Kleinzellen in
Tumoren.
Zschr.Krebsforsch. 51, 365 (1941)
- 35 HÖRNER, O.:
Lückenlose Serienuntersuchung an transplantiertem Mäuse-
krebs.
Zschr.Krebsforsch. 43, 377 (1936)
- 36 HORNSEY, S. and A.HOWARD:
Autoradiographic Studies with Mouse-Ehrlich-Ascites-Tumor.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 63, 915 (1956)
- 37 HOSEMANN, H.:
Die Grundlagen der statistischen Methoden für Mediziner
und Biologen. Georg-Thieme-Verlag Stuttgart 1949

- 38 HOWARD, A. and D.L.DEWEY:
Non-Uniformity of Labelling during DNA-Synthesis.
Exp. Cell Res. 24, 624 (1961)
- 39 HSU, T.C. and P.S.MOORHEAD:
Mammalian Chromosomes in Vitro.
J.Nat.Cancer Inst. 18, 463 (1957)
- 40 HSU, T.C.:
Mammalian Chromosomes in Vitro.
J.Nat.Cancer Inst. 14, 905 (1954)
- 41 HUTH, E.: Über die Entstehung von Riesenzellen beim MAT.
Zschr.Krebsforsch. 58, 228 (1952)
- 42 HUTH, E.: Über den unbeeinflussten Ablauf des MAT.
Zschr.Zellforsch. 59, 230 (1953)
- 43 JACOBJ, W.:
Über das rhythmische Wachstum der Zellen durch Verdoppelung ihres Volumens.
Arch.Entw.mechan. 106, 124 (1925)
- 44 JACOBJ, W.:
Die verschiedenen Arten des gesetzmässigen Zellwachstums und ihre Beziehungen zu Zellfunktion, Umwelt, Krankheit, maligner Geschwulstbildung.
Arch.Entw.mechan. 141, 584 (1942)
- 45 KLEIN, G.: Comparative Studies of Mouse Tumors with Respect to their Capacity for Growth as "Ascites Tumors" and their Average Nucleic Acid Content per Cell.
Exp. Cell Res. 2, 518 (1951)
- 46 KLEIN, G. and E. KLEIN:
Conversion of Solid Neoplasma into Ascites Tumors.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 63, 640 (1956)
- 47 KOBURG, E.:
Autoradiographische Untersuchungen zum Nukleinsäurestoffwechsel einzelner Zellarten der Lunge (Aussprache).
Verh.Dtsch.Ges.Pathol. 44, 160 (1960)

- 48 KOBURG, E. und B.SCHULTZE:
Autoradiographische Untersuchungen mit H^3 -Thymidin
über die Dauer der DNS-Synthese, der Ruhephase und der
Mitose bei proliferierenden Systemen wie den Epithelien
des Darms, des Oesophagus und der Cornea der Maus.
Verh.Dtsch.Ges.Pathol. 45, 103 (1961)
- 49 KOBURG, E. und W.MAURER:
Autoradiographische Untersuchungen mit H^3 -Thymidin über
die Dauer der DNS-Synthese und ihrem zeitlichen Verlauf
bei den Darmepithelien und anderen Zelltypen der Maus.
Biochem.Biophys. Acta 61, 229 (1962)
- 50 KOLLER, S.: Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen.
2. Aufl., 1943. Theodor Steinkopf-Verlag, Dresden und
Leipzig.
- 51 LEUCHTENBERGER, C.:
A Cytochemical Study of Pycnotic Nuclear Degeneration.
Chromosoma 3, 449 (1949)
- 52 LEUCHTENBERGER, C. and F.SCHRADER:
Relationship between Nuclear Volumes, Amount of
Intranuclear Proteins and DNA in Various Rat Cells.
Biol.Bull. 101, 95 (1951)
- 53 LEVAN, A.: Chromosomes in Cancer Tissue.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 63, 774 (1956)
- 54 LEVAN, A. and T.S.HAUSCHKA:
Endomitotic Reduplication Mechanisms in Ascites Tumors
of Mouse.
J.Nat.Cancer Inst. 14, 1 (1953)
- 55 LIMA-DE-FARIA, A.:
Differential Uptake of Tritiated Thymidine into Hetero-
and Euchromatin in Melanoplus and Secale.
J.Bioch.Biophys. Cytol. 6, 457 (1959)
- 56 LOEWENTHAL, H. und G. JAHN:
Übertragungsversuche mit carcinomatöser Mäuse-Ascites-
Flüssigkeit und ihr Verhalten gegen physikalische und chemische
Einwirkungen.
Zschr.Krebsforsch. 37, 439 (1932)

- 57 MAKINO, S. and K.KOYOKO:
Cytological Studies of Tumors. IX. Characteristic
Chromosome Individuality in Tumor Strain Cells in Ascites
Tumors of Rats.
J.Nat.Cancer Inst. 13, 1213 (1953)
- 58 MAKINO, S.:
Further evidence favoring the concept of the stem-cells
in ascites tumors of rats.
Ann. N.Y.Acad.Sci. 63, 818 (1955)
- 59 MAURER, W. und E.KOBURG:
Autoradiographische Untersuchungen mit H^3 -Thymidin über
den zeitlichen Ablauf der DNS-Synthese bei den Epithelien
des Darms und bei anderen Zellarten der Maus.
Verh.Dtsch.Ges.Pathol. 45, 103 (1961)
- 60 MAURER, W. und E.PRIMBSCH:
Grösse der beta-Selbstabsorption bei der 3H -Autoradiographie.
Exc. Cell Res. 33, 8 (1964)
- 61 OEHLERT, W., N.SEEMAYER, P.LAUF:
Autoradiographische Untersuchungen über den Generations-
zyklus der Zellen des Ehrlich-Ascites-Carcinoms der weissen
Maus.
Beitr.Pathol.Anat. 127, 63 (1962)
- 62 OEHLERT, W. und Th.BÜCHNER:
Mechanismus und zeitlicher Ablauf der physiologischen
Regeneration im mehrschichtigen Plattenepithel und in der
Schleimhaut des Magen-Darm-Trakts der weissen Maus.
Beitr.Pathol.Anat. 125, (1961)
- 63 OEHLERT, W. und B.SCHULTZE:
Kerngrösse als Ausdruck der synthetischen Aktivität des Kerns.
Beitr.Pathol.Anat. 123, 101 (1960)
- 64 PAINTER, R.B., R.M.DREW and B.G.GIAUQUE:
Further studies on Desoxyribonucleic Acid Metabolism in
Mammalian Cell Cultures.
Exp. Cell Res. 21, 98 (1960)

- 65 PATT, H.M., M.E.BLACKFORD and J.DRALLMEIER:
Growth characteristics of the Krebs Ascites Tumor.
Proc.Soc.Exp.Biol. and Med. 83, 520 (1953)
- 66 PROPST, A.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Differenzierung und Degeneration des Ascitestumors.
Beitr.Pathol.Anat. 127, 49 (1962)
- 67 QUASTLER, H. and F.G.SHERMAN:
Cell Population Kenetics in the Intestine Epithelium of the Mouse.
Exp. Cell Res. 17, 420 (1959)
- 68 RUTISHAUSER, A.:
Cytogenetik transplantabler tierischer und menschlicher Tumoren.
Neujahrsbl.d.Naturforsch.Gesellschaft Zürich 1963,
Kommissionsverlag Leemann A.G., Zürich.
- 69 RYSER, H., J.B.CAULFIELD and J.C.AUB:
Studies on Protein Uptake by isolated Tumor Cells.
J. of Cell Biol. 14, 255 (1962)
- 70 SCHAIRER, E.:
Kernmessungen und Chromosomenzählungen an menschlichen Geschwülsten.
Zeitschr.Krebsforsch. 43, 1 (1936)
- 71 SCHÜMMELFEDER, N.:
Der adaptive Differenzierungsverlust von Geschwulstzellen bei der Entstehung eines Ascites-Tumors.
Naturwissenschaften 10, 232 (1954)
- 72 SEEGER, P.G.:
Untersuchungen am Tumorasцитes der weissen Maus.
Arch.f.exp.Zellforsch. 20, 280 (1937)
- 73 STÖCKER E.: Zur Frage der funktionellen und pathologischen Kernschwellung (Autoradiographische Untersuchungen mit H^3 -Cytidin an der Rattenleber nach Thiocetamid).
Naturwissenschaften, 50, 130 (1963)

- 74 STÖCKER, E., W. MAURER und H. W. ALTMANN:
Autoradiographische Untersuchungen der Eiweiss- und
RNS-Synthese mit H^3 -Leucin und H^3 -Cytidin zur Deutung
der funktionellen Kernschwellung während des Funktions-
formwechsels im exokrinen Pankreas.
Klin. Wschr. 39, 926 (1961)
- 75 TAYLOR, J. A.:
Asynchronous Duplication of Chromosomes of Cultured Cells
of Chinese Hamster.
J. Biophys. and Biochem. Cytol. 7, 455 (1960)
- 76 TIMONEN, S.:
Mitosis in normal Endometrium and genital Cancer.
Diss. in Acta obstetr. Scand. 31/2, 1 (1950)
- 77 WERMEL, E. M. und L. W. SCHERSCHULSKAJA:
Über proportionelles (rhythmisches) Kernwachstum.
Zschr. Zellforsch. u. mikrosk. Anat. 20, 54, (1934)
- 78 Wissenschaftliche Tabellen.
Documenta Geigy, 6. Aufl. Herausgeber: J. R. Geigy A. G.
- 79 WRBA, H. und M. EDER:
Induktion von Zelldifferenzierung und Fermentaktivität bei
der Umwandlung von Ascites-Tumoren in solide Geschwülste.
Naturwissenschaften 49, 305 (1962)
- 80 WRBA, H.: Die Wirkung von Glukose auf die Aufnahme von hochmoleku-
laren Partikeln durch Tumorzellen in vitro.
Ztschr. Krebsforsch. 63, 415 (1960)

Herrn Professor Dr. Max EDER danke ich
herzlich für die Überlassung des Themas
und die allzeit grosszügige Unterstützung
und Förderung.

LEBENS LAUF

Ich wurde am 27. Februar 1938 als Sohn des Oberingenieurs Johann Löhrs und seiner Ehefrau Herma, geb. Janssen, in Emden/Ostfriesland geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Emden und Templin/Brandenburg wurde ich Ostern 1949 in das Gymnasium für Jungen in Emden aufgenommen, wo ich im Februar 1958 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1958 begann ich an der Universität Innsbruck Medizin zu studieren. Nach dem zweiten Semester legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung an der Universität Würzburg ab und bestand nach dem Sommersemester 1960 die ärztliche Vorprüfung an der Universität Hamburg. Vom zweiten klinischen Semester an studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, wo ich nach dem 11. Semester im Februar 1964 das medizinische Staatsexamen bestand.

Seit April 1964 arbeite ich als Medizinal-Assistent am Pathologischen Institut der Universität München.

